

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1912

THÈSE

N°

78

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

PAR

L. COTONI

Ancien interne des Hôpitaux de Paris

Né à Oissel, le 4 Novembre 1884.

LA VIRULENCE
DES PNEUMOCOQUES

Président : M. WIDAL

PARIS

G. STEINHEIL, ÉDITEUR

2, RUE CASIMIR-DELAVIGNE, 2

1912

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1912

THÈSE

N°

78

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

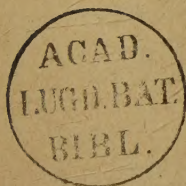
PAR

L. COTONI

Ancien interne des Hôpitaux de Paris

Né à Oissel, le 4 Novembre 1884.

LA VIRULENCE
DES PNEUMOCOQUES



Président : M. WIDAL

PARIS

G. STEINHEIL, ÉDITEUR

2, RUE CASIMIR-DELAVIGNE, 2

1912

Faculté de Médecine de Paris

LE DOYEN PROFESSEURS		M. LANDOUZY MM.
Anatomie.		NICOLAS
Physiologie.		CH. RICHET
Physique médicale.		WEISS
Chimie organique et Chimie générale.		DESGREZ
Parasitologie et Histoire naturelle médicale.		BLANCHARD
Pathologie et Thérapeutique générales.		ACHARD
Pathologie médicale.		WIDAL TEISSIER
Pathologie chirurgicale.		LEJARS
Anatomie pathologique.		PIERRE MARIE
Histologie.		PRENANT
Opérations et appareils.		HARTMANN
Pharmacologie et matière médicale.		POUCHET
Thérapeutique.		MARFAN
Hygiène.		CHANTEMESSE
Médecine légale.		THOINOT
Histoire de la médecine et de la chirurgie.		LETULLE
Pathologie expérimentale et comparée.		ROGER
Clinique médicale.		CHAUFFARD GILBERT DEBOVE LANDOUZY HUTINEL
Maladies des enfants.		
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale.		GILBERT BALLET
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.		GAUCHER
Clinique des maladies du système nerveux.		DEJERINE DELBET QUENU RECLUS N...
Clinique chirurgicale.		
Clinique ophtalmologique.		DE LAPERSONNE
Clinique des maladies des voies urinaires.		LEGUEU
Clinique d'accouchements.		BAR PINARD RIBEMONT-DESSAIGNE POZZI KIRMISSON ALBERT ROBIN
Clinique gynécologique.		
Clinique chirurgicale infantile.		
Clinique thérapeutique.		

Agrégés en exercice

MM.			
BALTHAZARD	DUVAL (P.)	LEQUEUX	RATHERY
BERNARD	GOUGEROT	LERI	RETTERER
BRANCA	GREGOIRE	LOEPER	RICHAUD
BRINDEAU	GUENIOT	MACAIGNE	ROUSSY
BROCA (A.)	GUILLAIN	MAILLARD	ROUVIERE
BRUMPT	JEANNIN	MORESTIN	SCHWARTZ
CAMUS	JOUSSET (A.)	MULON	SICARD
CARNOT	LABBE (M.)	NICLOUX	TERRIEN
CASTAIGNE	LANGLOIS	NOBECOURT	TIFFENEAU
CHEVASSU	LAIGNEL-LAVASTINE	OKINCZYC	ZIMMERN
CLAUDE	LECENE	OMBREDANNE	
COUVELAIRE	LENORMANT	PROUST	

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'École a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MON MAÎTRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

M. LE PROFESSEUR WIDAL

Membre de l'Académie de Médecine
Médecin de l'Hôpital Cochin.

*En hommage de reconnaissance et
de respectueux dévouement.*

A M. LE DOCTEUR M. NICOLLE

Professeur à l'Institut Pasteur.

A MES MAITRES DANS LES HOPITAUX

Externat.

M. le Docteur MONOD, M. le Docteur LAUNAY
M. le Professeur LEJARS
M. le Docteur Marcel LABBÉ

Internat provisoire.

M. le Docteur NETTER
M. le Professeur LETULLE
M. le Docteur CASTAIGNE
M. le Docteur BÉCLÈRE
M. le Docteur RIST

Internat.

M. le Docteur BELIN
M. le Docteur CAUSSADE, M. le Docteur MERKLEN
M. le Professeur WIDAL, M. le Docteur LEMIERRE
M. le Docteur CLAUDE, M. le Docteur BENSAUDE

A MES MAITRES DANS LES HOPITAUX DE ROUEN

M. le Docteur CERNÉ, M. le Docteur HALIPRÉ

INTRODUCTION

Je ne saurais aborder l'exposé de ces recherches sans remercier très sincèrement M. Maurice Nicolle, professeur à l'Institut Pasteur, qui les a inspirées et constamment dirigées. C'est grâce à son enseignement, à ses conseils que j'ai pu entreprendre et poursuivre cette étude de bactériologie. Il sait toute ma reconnaissance pour l'intérêt qu'il ne cesse de me témoigner depuis longtemps.

Une grande partie de ce travail a été faite en collaboration avec M. Truché, préparateur à l'Institut Pasteur. Quand j'abordai l'étude des pneumocoques, la pratique qu'il avait de cette espèce me fut précieuse. Depuis lors, notre collaboration a été aussi étroite qu'agréable, et j'ai plaisir à le remercier ici de la contribution qu'il a apportée à nos communes études.

Je me suis dispensé de longues indications bibliographiques, qui trouvent mieux leur place dans les articles de traités. J'ai cherché comment — au sens le plus large — on peut se représenter aujourd'hui la virulence des pneumocoques. Inutile d'insister sur l'intérêt de premier ordre qu'offre l'étude de la virulence, pour les médecins autant

que pour les bactériologues. Ce sont des observations cliniques, recueillies pendant mon internat, qui forment le fondement indispensable de ce travail; il eût été trop long de les rapporter ici, mais elles sont, d'une façon implicite, à la base des conclusions.

CHAPITRE PREMIER

LES PNEUMOCOQUES

Le microbe contenu, parfois à l'état pur, dans les crachats rouillés des pneumoniques, présente un faisceau de caractères qui rend son identification souvent facile. Le problème se complique dès qu'on s'adresse à des produits pathologiques où le pneumocoque est moins abondant, ou bien associé à des germes étrangers. En étudiant la flore des muqueuses chez des animaux sains, j'ai eu l'occasion de rencontrer dans le mucus certains microbes qui ne paraissent pas de prime abord faire partie des pneumocoques, et qu'une étude ultérieure révélait sans aucun doute comme tels. C'est que, si l'on regarde de près, les caractères absolument *constants*, appartenant à tous les échantillons de cette espèce, sont *peu nombreux*, et souvent on fait intervenir d'une façon plus ou moins implicite la notion d'origine (crachat pneumonique), dans leur identification. Pareille remarque s'applique d'ailleurs à beaucoup d'autres microbes. A ce titre, il n'est pas indifférent de noter que certaines espèces doivent autant leur « droit de cité » en bactériologie à la maladie dont elles sont issues, qu'à leurs caractères objectifs. C'est souvent la clinique qui oriente

la classification d'un microbe; l'histoire du pneumocoque est un exemple.

Il a été, dès le principe, le *microbe de l'exsudat pneumonique*. C'est là que Talamon l'isole (1883), que Fränkel l'étudie et lui donne son nom caractéristique (1883-86). Weichselbaum le trouve bientôt dans le sang des pneumoniques. A partir de 1886, sa présence est signalée dans des complications de la pneumonie : pleurésies, méningites, endocardites, arthrites (Fränkel, Weichselbaum, Netter, etc.). Peu à peu, on rencontre des microbes présentant les mêmes caractères dans des affections étrangères à la pneumonie : le pneumocoque devient responsable de certaines péritonites, méningites, pleurésies, otites, etc., pour ne citer que les plus importantes. Son intervention est bientôt étudiée dans les maladies oculaires [Morax (1894); Gasparini (1894), etc.]

On sait que dès 1881, Pasteur avait décrit dans la salive d'un enfant mort de la rage un microbe qu'il retrouva ensuite dans la bouche des enfants broncho-pneumoniques, puis des sujets sains. Il avait fait connaître les caractères essentiels : outre le pouvoir septicémique et vaccinant vis-à-vis du lapin, la forme en diplo auréolé, la mort rapide des cultures, l'absence de pouvoir pathogène pour les oiseaux. Il fallut les études de Talamon sur le « coccus lancéolé », de Fränkel sur le « pneumocoque » pour que le « microbe septicémique de la salive » retrouvé dans une lésion classique depuis Laënnec, acquit droit de cité. En même temps se confirmaient des observations isolées qu'Eberth, puis Koch avaient faites de cocci ellipsoïdes sur des cadavres de pneumoniques.

Bientôt on trouvait le pneumocoque dans le mucus de la bouche et des fosses nasales chez l'homme sain. Les premières recherches furent faites par Fränkel même; Netter (1887), Gasparini (1894), Bezançon et Griffon (1898), Bürger (1905), etc., les ont continuées, et le pneumocoque paraît un hôte habituel de la bouche. Beco (1), faisant l'autopsie, souvent plus de 12 heures après la mort, de 6 sujets morts brusquement ou rapidement, a relevé 3 fois la présence de pneumocoques dans les poumons; chez 17 cadavres de malades, il a rencontré toujours des germes et le plus souvent des pneumocoques. Je ne citerai pas ici les nombreux auteurs qui ont étudié au point de vue bactériologique le parenchyme pulmonaire : ou bien ils concluent à sa stérilité, ou bien ils étendent à l'homme, par analogie, des résultats obtenus chez l'animal; le problème est loin d'être résolu. Comme on le verra plus loin, le pneumocoque a été souvent rencontré dans le poumon des animaux sains. Le domaine du « microbe de l'exsudat pneumonique » s'est donc agrandi, et l'origine de ces germes est insuffisante aujourd'hui à les caractériser. Aussi essaiera-t-on maintenant de les délimiter.

Parmi les caractères du pneumocoque, quatre sont fondamentaux : *immobilité, absence de spores, capsule, coloration par le Gram*; les autres sont plus ou moins inconstants, mais on conçoit combien les quatre premiers sont trop généraux pour permettre une identification.

La *forme* passe — à juste titre — pour un des meilleurs critères. Cet aspect ovoïde, lancéolé, en grain d'orge,

(1) *Arch. Méd. exp. et An. path.*, 1899, tome XI, p. 317.

en lancette, en flamme de bougie, joint à la disposition des éléments en diplo, en 8, est classique, souvent plus net encore dans les humeurs que dans les milieux de culture. Lorsque tous les éléments d'un champ microscopique ont cette forme, le diagnostic n'hésite guère, mais cet aspect n'est pas constant. Le groupement en chaînettes plus ou moins longues et flexueuses ne saurait égarer le diagnostic lorsque les éléments de la chaînette conservent une forme bien lancéolée et une disposition en diplo. Il n'en est plus de même dans le cas suivant : chaînettes d'éléments arrondis, divisés chacun par une bande claire perpendiculaire à l'axe de la chaînette. Cet aspect, plus net avec des colorants faibles (thionine), est commun au pneumocoque et au streptocoque. Pour le premier, on l'observe dans les milieux liquides, et non dans les humeurs; quelquefois sur les milieux solides (gélose) pour certains échantillons. Lorsqu'on fait un diagnostic erroné, c'est en général un pneumocoque qu'on prend pour un streptocoque; on cherche inutilement dans le champ du microscope un élément lancéolé (pneumocoques anormaux); le diagnostic est pour certains aspects des chaînettes quasi impossible, même si l'on est exercé à cette difficulté.

Une autre erreur vient de ce qu'une culture streptococcique la plus pure peut contenir des formes lancéolées. Il faut alors examiner un grand nombre d'éléments. Chez les streptocoques, souvent une chaînette présente en même temps que des cocci arrondis, des formes allongées : elle peut se terminer par un diplocoque lancéolé. Ce polymorphisme paraît appartenir plutôt au streptocoque qu'au pneumocoque. La forme nettement

arrondie des éléments est aussi en faveur du streptocoque; ceux du pneumocoque tendent toujours, sinon vers la forme lancéolée, au moins vers une forme ovale, en « grain d'orge ». Dans les cas difficiles, l'aspect microscopique sur milieux solides, quelquefois plus typique chez les pneumocoques qu'en milieux liquides, pourra lever l'hésitation.

Dans d'autres cas, un aspect anormal égare le diagnostic. On ne doit pas, tout en reconnaissant la valeur du critérium, accorder à la forme lancéolée une signification absolue. Ce sont les cas rares où tous les éléments d'une culture prennent la forme bacillaire. M. Truche et Mine Gosset ont publié un exemple de cette particularité (1):

Une malade, à laquelle le Docteur Gosset avait enlevé un rein, présente 3 ans après, des symptômes suspects du côté de l'autre. On examine l'urine, dont le sédiment pyoïde, peu abondant, est ensemencé en totalité sur gélose-ascite. Colonies fines, mais plus opaques que celles du pneumocoque. Au microscope, aspect de bacille diphtérique court (diagnostic confirmé par plusieurs personnes compétentes). On repique les colonies dans les deux milieux suivants : 1^o eau peptonisée à 2 p. 100, salée à 0,5 p. 100, et glucosée à 0,2 p. 100; 2^o même milieu + 1/3 d'ascite. Dans le milieu 1, formes bacillaires; dans le milieu 2, formes lancéolées. Ces différences se sont maintenues pendant quelque temps, puis les formes caractéristiques ont reparu dans le milieu 1, de plus en plus nombreuses et finalement dominantes. A l'origine, le microbe tuait la souris (à dose un peu forte, il est vrai), et, dans les humeurs des animaux infectés, on retrouvait les *formes lancéolées classiques*.

Cette forme bacillaire, qu'on rencontre souvent chez quelques rares individus d'une culture est probablement

(1) *Soc. biologie*, 28 janvier 1911.

en rapport avec des conditions défavorables au pneumocoque. Dans le même ordre de faits, ajoutent les auteurs de cette note, rentrent les formes monstrueuses qu'on rencontre dans l'exsudat péritonéal des cobayes infectés. J'ai observé une déviation de forme chez un pneumocoque isolé par le Dr Magrou, de l'urine d'un enfant. Ce germe présentait en eau peptonisée des éléments en grains d'orge remarquablement courts, dont le groupement en amas achevait de les rendre très semblables à des staphylocoques. En milieu-ascite et dans les humeurs de la souris, forme lancéolée encapsulée. D'après ces exemples, il serait recommandable de faire des cultures dans des milieux-ascite, quand le diagnostic hésite.

La *capsule* est un caractère classique des pneumocoques, plus facile à mettre en évidence dans les humeurs que dans les milieux de culture. On serait tenté de le considérer comme distinctif de l'espèce. Dans les cas où elle coexiste avec une forme nettement lancéolée, elle constitue évidemment un caractère important en faveur du pneumocoque, mais elle peut exister aussi chez certains streptocoques. Bordet a montré qu'elle se développait chez des streptocoques inoculés dans le péritoine du cobaye ; c'est là, il est vrai, un mode d'inoculation spécial, qui favorise aussi chez le pneumocoque le développement de la capsule. Mais des streptocoques encapsulés ont été décrits par différents auteurs (Von Lingelsheim, Pasquale, Schütz, etc.). La capsule n'est donc pas un caractère absolument spécial au pneumocoque.

Quelle valeur possèdent maintenant les *caractères de culture*? On sait que le pneumocoque s'accommode de la

vie aérobie ou anaérobie. Il est classique d'assigner 37° comme température optimum ; des températures plus basses, 35° par exemple, conviennent souvent aussi bien, et même certains échantillons poussent à la température ordinaire ; ils donnent, contrairement à l'opinion courante, des colonies sur la gélatine (les échantillons A, Gosset, 316 isolés chez un ver à soie sont du nombre). Il faut noter comme un bon caractère général des pneumocoques, la difficulté de leur culture et de la conservation de leurs vitalité et virulence dans les milieux usuels. Pasteur et tous ceux qui ont étudié les pneumocoques, ont éprouvé cette difficulté. En bouillon ordinaire, le développement des germes trouble le milieu, commençant souvent en surface, puis donne lieu à un dépôt pulvérulent. Après quelques passages en bouillon ordinaire, la culture devient souvent impossible : des acides, en particulier acide formique (Würtz et Mosny, 1894); acide lactique, etc., se forment dans les cultures.

Ces faits ont rendu nécessaire l'emploi de milieux additionnés d'humeurs animales (ascite, sang, sérum), que Bezançon et Griffon ont en particulier préconisés. Ces milieux restent précieux lorsqu'on a affaire à des pneumocoques virulents, souvent fragiles ; plus loin, on verra que leur emploi peut être restreint de beaucoup. Pour une étude systématique, ils offrent l'inconvénient d'une composition variable. Je signalerai donc maintenant le mode de préparation et les avantages de deux milieux fort simples qui ont été employés exclusivement dans cette étude.

Milieu T. — Dissoudre dans 1 litre d'eau distillée, 40 grammes de peptone Chapoteaut, 5 grammes de sel, 2 grammes de glucose pur. Alcaliniser (réaction franchement violette au tournesol). Filtrer, répartir et stériliser.

La peptone Chapoteaut (albumoses + peptone) ne peut être remplacée ni par la peptone Witte (albumoses), ni par la peptone Defresne (peptone + peptides), sans que les cultures deviennent misérables et s'arrêtent après un ou deux passages. Le titre de la peptone Chapoteaut ne peut être abaissé de moitié sans qu'on provoque une diminution croissante du développement et un arrêt après 6 ou 7 passages. Le sel marin ne saurait être suppléé par KCl (cultures misérables). Enfin il ne convient point d'élever la teneur en glucose au-dessus de 0,2 p. 100, sans quoi l'acidité s'exagère et les germes sont fatalement atteints dans leur vitalité (et, *a fortiori*, leur virulence). Avec 0,2 p. 100 de glucose, on n'observe qu'une acidité légère et sans inconvénients pratiquement. Avec 0,1 p. 100, les cultures deviennent très maigres. Il faut donc « en passer » par 0,2 p. 100 de glucose.

Le milieu T a l'avantage de permettre indéfiniment des repiquages (comparer les résultats si précaires obtenus avec le bouillon). L'expérience suivante fixera les idées à ce sujet. On ensemence 1 goutte de sang pneumococcique (souris) dans 10 centimètres cubes de milieu T et on fait à 24 heures d'intervalle, 16 repiquages, toujours avec 1 goutte de semence pour 10 centimètres cubes de liquide (température de culture : 37°). Au cours des 16 passages, l'abondance n'a pas varié, et dans le dernier tube, les germes étaient demeurés virulents. L'expérience montre d'ailleurs que les repiquages peuvent être indéfiniment continués. Ce milieu fournit des cultures d'une *abondance remarquable*; on s'en fera une idée en sachant que pour certaines races, le dépôt de 10 centimètres cubes obtenu par centrifugation représente environ 3 centigrammes de matière microbienne vivante.

Gélose au milieu T. — Cette gélose est faite au titre de 2. p 100

avec le milieu précédent. La gélose une fois dissoute dans le milieu T chauffé, le mélange, rendu alcalin, est immédiatement réparti en tubes et stérilisé. Au sortir de l'autoclave, avant d'incliner les tubes, on laisse (pendant quelques minutes) les flocons les plus volumineux qui obscurcissent la gélose, se déposer au fond des tubes. La suppression de la filtration, qui simplifie la technique, a l'avantage de rendre le milieu plus nutritif (phénomène général indiqué depuis longtemps par M. Nicolle). La transparence est très suffisante, et *l'on peut parfaitement éliminer l'emploi de la gélose-ascite pour la culture des pneumocoques.*

Les caractères de culture des pneumocoques sur ces deux milieux sont les suivants :

En *milieu T*, trouble plus ou moins dense. Le dépôt, d'ailleurs inconstant, offre toujours une consistance *homogène* ; par agitation, il se soulève en nuage qui trouble le liquide d'une manière *uniforme*. L'aspect limpide du milieu, avec dépôt grumeleux au fond ou sur les parois du tube, *n'a jamais été observé* sur plus de 60 races de pneumocoques, et constitue un caractère négatif très important. Le même aspect est classique chez beaucoup de streptocoques : même après agitation, les grumeaux suspendus dans le milieu de culture ne se dissolvent pas, les germes restent agglutinés. Malheureusement pour le diagnostic, certains streptocoques troublent uniformément le bouillon et le milieu T ; dans les cas où existe en même temps un dépôt, il est souvent grumeleux, grenu, par opposition au dépôt homogène du pneumocoque (1).

(1) J'ai pu étudier par comparaison 33 races de streptocoques grâce à l'obligeance de M. Jupille.

Sur la *gélose au milieu T*, les colonies des pneumocoques âgées d'un jour ont un aspect très variable. La forme est ronde ou ovale, rarement ombiliquée au centre; la hauteur variable, souvent minime, le diamètre de 1 à 4 millimètres. La transparence des colonies, réalisant le type « goutte de rosée », est un caractère classique; la comparaison s'applique parfaitement aux colonies volumineuses de certains échantillons, mais cet aspect est loin de s'observer pour tous les autres (pas plus sur *gélose ordinaire* que sur *gélose T*). Ce qu'on observe le plus souvent, ce sont des colonies légèrement transparentes, arrondies, du volume d'une tête d'épingle; après 24-48 heures, les colonies peuvent perdre toute transparence, prendre un aspect crêmeux, jaunâtre ou blanchâtre, qui n'a plus rien de caractéristique. Dans ces cas, on n'oubliera pas d'examiner les colonies plus récentes, et le diagnostic, on doit le dire, est souvent très difficile avec le streptocoque, sinon impossible par le seul examen des colonies. On est souvent frappé chez les colonies volumineuses qui réalisent le type classique « en goutte de rosée » par leur consistance visqueuse : l'öse entraîne parfois un véritable filament. La viscosité des colonies paraît liée chez de tels échantillons à un développement exubérant de la capsule (ce caractère s'observe très accusé chez certains microbes encapsulés, tels que le pneumobacille). Ce sont sans doute de pareils pneumocoques dont Schottmüller a voulu faire une variété de streptocoques (*streptococcus mucosus capsulatus*), et que les auteurs américains (Bürger, Hiss, etc.) ont rangé entre le pneumocoque et le streptocoque ou dans les pneumocoques; il

ne semble pas qu'il y ait lieu jusqu'ici d'instituer pour eux une espèce particulière.

Un caractère de première importance des pneumocoques est la *solubilité dans la bile*. Mais cette propriété paraît liée à la virulence; c'est avec la virulence qu'elle sera mieux étudiée.

Un autre critérium, souvent proposé, est l'*action du pneumocoque sur les milieux au sang*. Gilbert et Fournier (1896) avaient préconisé l'emploi du sang humain ou animal comme milieu de culture (sang défibriné, puis rendu solide par la chaleur). Ce milieu offrait un double avantage pour l'étude du pneumocoque : culture facile et aspect caractéristique. Le milieu passe de la teinte chocolat à une teinte verdâtre, puis plus tard jaune isabelle. L'action des pneumocoques sur le sang se décompose en réalité en deux phénomènes (dont le premier peut manquer) : l'hémolyse et le changement de coloration de l'hémoglobine. On peut les dissocier en employant du sang laqué. J'ai étudié à ce point de vue 33 races de pneumocoques (cultures de 24 heures en milieu T, à 37°). Une émulsion globulaire dans l'eau physiologique à 5 p. 100 était ajoutée en quantités égales à la culture, le tout mis à l'étuve. Sur 33 pneumocoques, 9 seulement provoquaient l'hémolyse, tandis que 33 streptocoques étudiés comparativement hémolysaient tous. La propriété hémolysante n'est donc aucunement l'apanage du pneumocoque. Pour tous les pneumocoques, au contraire on observait un changement de couleur plus ou moins accentué de l'hémoglobine. La teinte la plus souvent observée était rose sale, fraise écrasée, violacé, lie-de-vin; chez quelques-uns même, bistre clair,

chamois, feuille morte et brun verdâtre. Dans les mêmes conditions d'expérience, les streptocoques examinés n'ont manifesté que des changements de coloration beaucoup moins accentués. Il est donc probable, sans aborder l'explication de ce phénomène, que les cultures de pneumocoques possèdent à un degré marqué la propriété de transformer l'hémoglobine. Cette propriété ne leur est pas particulière. Schottmüller a pu distinguer à côté du streptocoque de l'érysipèle, un streptocoque mitior ou viridans, qui donne des colonies vertes sur gélose au sang, mais dans les conditions d'expérience présentes, cette transformation de l'hémoglobine est infiniment plus marquée chez les cultures de pneumocoques. De ces constatations, il faut rapprocher l'aspect verdâtre, quelquefois fluorescent, que prennent les cultures en bouillon de sang pneumococcique, et la teinte verte ou même bronzée, feuille morte, des fausses membranes pleurales ou péritonéales chez le lapin et le cobaye, peut-être aussi la coloration franchement verte du pus pneumococcique. L'étude de l'action de ces germes sur l'hémoglobine demanderait à être reprise; il semble bien, indépendamment de toute action hémolytante, qu'ils possèdent vis-à-vis de l'hémoglobine des propriétés spéciales, qui pourraient servir à leur diagnostic.

La *fermentation de l'inuline* étudiée chez les pneumocoques par des auteurs américains (Park et Williams, Hiss, Bürger, etc.) est un caractère trop inconstant pour servir à l'identification, et eux-mêmes citent des streptocoques qui se comportent de façon analogue.

Les *caractères pathogènes* ont infiniment plus de valeur.

La *souris blanche* (15-18 grammes) mérite de demeurer l'animal de choix ; à quantités égales de cultures inoculées, elle est plus sensible que le lapin et le cobaye ; c'est à elle qu'il faut s'adresser d'abord en présence d'un germe suspect. Dans le cas de pneumocoques actifs sur la souris, le tableau est bien connu : septicémie, présence de germes (en nombre très variable, selon les cas) encapsulés et lancéolés dans le sang et les viscères, rate hypertrophiée violette, sang noir. Les abcès au point d'inoculation sont peu fréquents et s'observent plutôt dans les cas qui guérissent. Toutefois il est juste de faire une réserve sur la sensibilité de la souris au pneumocoque ; *elle a été fort exagérée*. On répète volontiers que la souris est sensible à des doses infinitésimales de cultures pneumococciques, « animal-réactif », véritable « pierre de touche » ; beaucoup d'auteurs renchérissent sur cette opinion. Rien n'est plus éloigné des faits. La souris résiste souvent à l'inoculation de produits pathologiques (pus), riches en pneumocoques, ou de cultures pures. Bien des pneumocoques ne tuent pas la souris (dans le muscle), à la dose d'un centimètre cubé de culture ; les souris peuvent même résister à l'injection musculaire de doses colossales (12 centigrammes de matière pneumococcique vivante, obtenus par centrifugation). Je néglige ici les effets de l'injection péritonéale, particulièrement aveugle chez un animal de petite taille.

Le *lapin* (1500-1800 grammes) est beaucoup moins sensible que la souris. Les pneumocoques actifs sur le lapin (injection musculaire) sont presque toujours très virulents pour la souris ; mais la virulence générale chez le lapin,

comme chez la souris, paraît exagérée dans les traités classiques. Cela est aisé à comprendre : les chercheurs, à moins d'étudier systématiquement une espèce microbienne, s'adressent presque toujours à des échantillons virulents et ont eu entre les mains dans le cas présent des pneumocoques d'exception. Quand l'animal succombe, on observe une septicémie pure, comparable à celle de la souris, ou une pyohémie : léger exsudat *loco læso* (inconstant), épanchements purulents de la plèvre ou du péritoine, quelquefois des deux, plus rarement péricardite. La rate est *grosse, dure, violet sombre*. Le foie, l'intestin, les poumons sont couverts de fausses membranes vertes, quelquefois d'une couleur bistre, ou bronzée, ou feuille-morte ; cette teinte, mélange de *brun* et de *vert*, est assez caractéristique pour permettre quelquefois à un observateur non averti de soupçonner l'origine *pneumococcique* de l'infection. Les inoculations intra-veineuse, intra-péritonéale, intra-pleurale constituent, à doses égales, des modes d'infection plus sévères. Injectées dans le poumon, les cultures peuvent produire des foyers d'hépatisation. Avec des cultures affaiblies par vieillissement introduites sous la peau, Bezançon et Griffon ont observé la mort lente des lésions locales fibrino-purulentes, des lésions du poumon et de la plèvre ; dans le péritoine, une réaction péritonéale non mortelle, puis des arthrites. Ces arthrites s'observent aussi quand on injecte des doses énormes de cultures virulentes à des lapins vaccinés. L'inoculation cornéenne produit une kératite suppurée, puis la mort ; la marche aiguë de cette kératite est toute différente d'ailleurs de la marche lente de l'ulcère de la cornée humaine

Neufeld a reproduit l'érysipèle chez le lapin par l'injection de pneumocoques sous la peau de l'oreille.

Il est encore plus rare de rencontrer des pneumocoques actifs sur le *cobaye* (qui est cependant plus sujet aux infections pneumococciques spontanées que le lapin). L'injection intra-musculaire amène rarement une septicémie, plus souvent la pleurésie ou la péritonite purulentes mortelles, plus souvent encore un simple empâtement local suivi de guérison. On tue plus facilement les animaux en injectant la culture dans les séreuses (plèvre, péritoine), mieux encore dans le testicule.

Chez le *rat*, le *chien*, le *mouton*, l'injection intra-pulmonaire (ou intra-trachéale dans certains cas) reproduit l'hépatisation pneumonique. Les *oiseaux* sont réfractaires : Rovighi a cependant réussi à infecter avec de la salive des pigeons refroidis.

Tels sont les caractères sur lesquels se fonde habituellement l'identification du pneumocoque. En rigueur, on doit reconnaître que — mis à part les quatre caractères : coloration par le Gram, absence de spores, immobilité, capsule, — *aucun des caractères n'est constant*. La morphologie peut varier et égarer le diagnostic, l'aspect des cultures n'a souvent rien de spécial, le critérium précieux de la solubilité dans la bile fait souvent défaut, les réactions sur l'hémoglobine ne sont pas assez connues, le critérium de l'inoculation s'applique aux seuls germes virulents. En pratique toutefois, il faut bien dire que ces critères manquent rarement tous à la fois ; à supposer cette circonstance réalisée, on se trouverait en présence d'un microbe momentanément impossible à classer parmi les pneumocoques.

Même s'il était un pneumocoque, il faudrait attendre ou provoquer — si possible — l'apparition d'un nouveau caractère, pour le classer dans cette espèce. En ce qui concerne cette étude, les germes dont la nature pneumococcique n'était pas rigoureusement établie ont été éliminés, et c'est sur des échantillons authentiques que la virulence a été étudiée.

En terminant ce chapitre, il faut mentionner pourquoi le *critérium de l'agglutination*, important chez d'autres espèces microbiennes, a été négligé dans ce chapitre. Des expériences répétées, faites en collaboration avec M. Truche (1), nous ont montré le peu de valeur de ce critérium dans le diagnostic des pneumocoques, cette espèce microbienne offrant une tendance marquée à l'individualisation des échantillons. Le diagnostic des infections humaines à pneumocoques n'offre guère (d'après l'étude de 38 sérums de pneumoniques, souvent avant et après la crise), plus de certitude; le sérum des malades ne possède pas un pouvoir agglutinant assez marqué, ou le pneumocoque est un germe peu agglutinable : ces deux hypothèses ne sont pas exclusives d'ailleurs l'une de l'autre. Il peut arriver même — fait d'apparence paradoxale, — que certains pneumocoques, agglutinés par des sérums humains normaux, résistent aux sérums des malades dont ils proviennent.

(1) *Ann. I. Pasteur*, 1912, p. 313.

CHAPITRE II

LA VIRULENCE.

Avant d'aborder l'étude de la virulence chez les pneumocoques, il faut dire comment peut être conçue et mesurée cette propriété. La virulence est la *végétabilité in vivo*, aptitude qui permet à certains microbes de se développer dans les humeurs animales comme d'autres font dans les milieux de culture. Ainsi un pneumocoque extrait de l'exsudat alvéolaire (crachats) ou du sang d'un pneumonique est défini, rien que par son origine, virulent chez l'homme : il peut d'ailleurs être dénué de virulence chez la souris et les autres espèces. Au contraire, le pneumocoque qu'on isole dans la gorge n'est pas nécessairement virulent pour l'homme. Le microbe qui vit à la surface des épithéliums est à la limite de l'organisme ; lorsqu'ayant franchi la muqueuse, il s'installe dans un ganglion ou passe dans le sang ou la lymphe pour se multiplier, il est virulent, résiste à la destruction. Parmi les germes qui pullulent dans les voies digestives et les premières voies respiratoires, si certains pénètrent à travers les épithéliums, les virulents continuent seuls à végéter dans l'organisme. Les désordres produits sont d'intensité fort variable ; le

Trypanosoma Lewisi, si fréquent dans le sang des rats, paraît supporté sans dommage : il est par définition virulent, puisqu'il fait partie de l'organisme comme les globules rouges qu'il accompagne.

Une autre propriété des microbes doit être distinguée de la virulence, c'est le *pouvoir toxigène*. En pratique, il est malaisé, dira-t-on, de discerner la part respective de ces deux propriétés, dans la terminaison mortelle d'une infection. Une souris reçoit une culture de pneumocoques dans les muscles : est-ce à la virulence ou au pouvoir toxigène des germes qu'elle doit de succomber ? Il est difficile de résoudre ce problème. Problème mal posé d'ailleurs. Le pouvoir toxigène n'est pas un facteur de virulence ; c'est une propriété qui existe et se développe souvent dans les mêmes conditions expérimentales que la virulence, — mais *pas toujours*. L'histoire des autres microbes montre que certains peuvent se montrer toxiques, sans être virulents : les deux propriétés sont alors dissociées. L'exemple des bacilles diphtérique et tétanique est bien connu : ces germes, localisés dans le pharynx ou au niveau d'une plaie, ne se multiplient qu'*in situ*, n'envahissent pas la circulation et amènent la mort par la diffusion de leurs toxines.

C'est naturellement l'inoculation qui permet de reconnaître qu'un germe est virulent, c'est-à-dire capable de végéter dans les humeurs. Maintenant, comment peut-on mesurer la virulence ? Il faut arriver, de toute nécessité, à exprimer cette propriété abstraite de certains microbes, par des grandeurs mesurables, car nous n'observons jamais la virulence en soi, mais ses effets sur l'animal ; il

faut introduire dans cette qualité des notions de quantités, de mesures.

Lorsqu'on inocule une souris avec une culture de pneumocoques, la septicémie mortelle résulte, d'une façon évidente, du conflit de *deux* forces. L'une est représentée par la virulence du microbe inoculé, c'est-à-dire par son aptitude à végéter dans les humeurs de la souris, l'autre par la résistance de cet animal. Pour peu qu'on y réfléchisse, on voit que le rapport de ces deux forces doit exprimer précisément l'intensité de l'infection. La virulence étant V , l'intensité de l'infection I , la résistance R , on peut poser que $I = \frac{V}{R}$ ou $V = IR$, expression qui découle de la précédente. La virulence est évidemment en raison directe de l'intensité de l'infection et de la résistance de l'animal. Plus une infection est intense (et, à la limite, mortelle), plus on est fondé à penser que la virulence est forte ou que la résistance est faible chez la souris faisant les frais de cette infection. De deux pneumocoques, l'un tuant exclusivement la souris nouveau-née, l'autre tuant aussi la souris adulte, toutes choses étant égales, le second est le plus virulent.

Comment parvient-on maintenant à la mesure pratique de la virulence? Comment mesurer I et R ? D'abord, la résistance de l'animal : elle est bien difficile à évaluer. On ne peut le faire qu'en connaissant la virulence, et elle est précisément l'inconnue. Nous sommes forcés de nous mettre dans des conditions telles que la résistance soit constante, c'est-à-dire négligeable. On n'agit pas autrement dans la pratique en inoculant un grand nombre de

souris choisies aussi semblables que possible (âge, poids, état de santé antérieur). On admet alors implicitement que toutes les souris inoculées possèdent un égal degré de résistance. Il est clair que cette résistance varie d'un animal à l'autre : plus on multiplie les animaux, plus on divise l'erreur. D'où le précepte d'inoculer toujours plusieurs animaux pour titrer la virulence.

Dans $V = IR$, il nous reste donc pour connaître V , à évaluer I . Cette estimation devra être d'autant plus rigoureuse qu'elle peut seule permettre maintenant de savoir le degré de la virulence, I demeurant le seul facteur mesurable. Or à quels signes peut-on reconnaître qu'une infection est plus ou moins intense? Dans le cas où la souris résiste, combien il est difficile — voire impossible — de calculer l'intensité de l'infection dont elle a souffert! Qu'on suppose deux souris semblables, ayant reçu des doses égales de cultures. L'une guérit sans manifester aucun trouble, l'autre est abattue, dyspnéique, maigrit, puis recouvre la santé après plusieurs jours. Il y a toutes chances pour que le second pneumocoque soit plus virulent que le premier; mais dans quelle mesure? Le facteur « intensité d'infection » ne se prête donc pas à une mesure précise. Nous sommes amenés, cherchant toujours un critérium, à appeler *intense* une infection mortelle, et *virulent* le pneumocoque qui tue la souris. Les échantillons qui ne font pas périr cette espèce, échappent ainsi à toute mesure : rien ne nous permet plus de les comparer entre eux ni aux autres. C'est ainsi qu'on arrive à employer un critérium, en somme grossier, pour estimer la virulence.

L'instrument de mesure n'offrant qu'une précision relative, raison de plus pour l'appliquer à des objets parfaitement comparables, pour introduire en un mot plus d'exactitude dans les recherches. Le terme d'infection est trop général : l'infection se présente sous des formes cliniques spéciales qui ne sont entre elles nullement équivalentes. Pour les pneumocoques et la souris, c'est le type septicémie qu'on observe. On ne peut donc comparer les unes aux autres que des infections du type septicémique. Si l'on rencontrait une race de pneumocoques amenant la mort de la souris en trois mois, on ne serait pas en droit de la comparer, si ce n'est pour l'opposer, aux races habituelles ; son *mode* de virulence lui ferait dépasser les limites de l'espèce ; c'est avec un microbe d'infection chronique, tel que le bacille tuberculeux, qu'il faudrait le mettre en parallèle. Dans le titrage de la virulence d'un pneumocoque, chez le lapin et le cobaye, on est souvent en présence d'un type encore différent (septico-pyohémie).

Une notion *qualitative* s'introduit donc — qu'on le veuille ou non, — dans le calcul de la virulence, celle de la forme clinique de l'infection (type aigu, type chronique et leurs différentes variétés). D'autre part, la *terminaison mortelle* ne s'appliquant qu'au cas particulier de virulence forte, il importe de fixer tous les facteurs dont la variation compromettrait l'exactitude des résultats. Les valeurs « dose injectée » et « temps de survie » n'ont pas été introduites jusqu'ici dans le calcul. Entre un pneumocoque qui tue la souris à la dose d'un centimètre cube, et celui qui la fait périr au millième de centimètre cube, il est aisé de comprendre que le second est mille fois plus virulent que le

premier. De même, en supposant maintenant deux pneumocoques qui font périr la souris aux mêmes doses, l'un régulièrement en 16 heures, l'autre en 5 jours, on est fondé à penser que le premier est plus virulent. Dans le cas des pneumocoques, le facteur « temps de survie » n'a qu'une importance secondaire, je m'empresse d'ajouter, *entre certaines limites* : la septicémie de la souris est presque toujours mortelle en peu de jours. Le même facteur deviendrait le critérium fondamental si l'on avait affaire à des germes d'infection franchement chronique : on appellerait alors très virulent un échantillon tuant en un mois, moins virulent celui qui tuerait en six mois, par exemple.

Ainsi, l'intensité de l'infection croît en raison directe de la dose injectée, et en raison inverse du temps de survie, et c'est ce rapport $\frac{D}{T}$ ($D =$ dose, $T =$ temps) qui finit par exprimer la virulence, toutes les autres conditions de l'expérience étant égales. Il était indiqué au début de cette étude de fixer la valeur des résultats que fournit le titrage de la virulence.

CHAPITRE III

VIRULENCE DES PNEUMOCOQUES HUMAINS « AU DÉPART »

L'expression « au départ » désigne la virulence d'un pneumocoque qui vient d'être isolé de l'organisme, et n'a pas encore passé par l'animal (1).

Technique suivie.

Milieux employés.

1° Milieu T.

2° Gélose au milieu T (remplaçant avec avantage la gélose-ascite). Le mode de préparation de ces deux milieux a été indiqué au chapitre premier.

3° Milieu T + 1/3 d'ascite. On est obligé souvent (mais pas toujours) d'« en passer » par l'addition de liquide d'ascite pour obtenir la *première culture*, lorsqu'on part des colonies originelles sur gélose. Après ce passage *unique* en milieu ascite, les repiquages ultérieurs en milieu T réussissent *d'une façon constante*. Le succès des

(1) Les pneumocoques étudiés dans ce travail proviennent tous de sujets malades, le plus souvent pneumoniques.

cultures n'aurait pu être prévu *a priori*; il démontre que le pneumocoque se déshabitue des albuminoïdes humains avec une grande rapidité (au moins quand on lui offre un milieu très riche en peptone). Dans cette technique, l'emploi de l'ascite est donc réduit à une seule culture. Le milieu T pur et simple (ou la gélose correspondante) convient par contre pour l'isolement; et cela se conçoit bien, puisqu'il se trouve alors additionné d'albuminoïdes humains.

Isolement du pneumocoque.

Ensemencement sur gélose au milieu T. — Les produits purs sont ensemencés tels quels; les crachats, après lavages successifs dans 10 verres d'eau physiologique stérile. Après culture de 24 heures à 37° (1), on prélève 6 à 12 colonies et l'on répique dans 6-12 tubes de milieu T-ascite. Le lendemain, repiquage en milieu T, puis titrage de la virulence avec ces cultures en milieu T, âgées de vingt-quatre heures. Cette première technique est *seule* rigoureuse; on a ainsi des cultures nées d'une seule colonie; l'expérience montre que les différentes colonies de pneumocoques nées d'un produit pathologique offrent souvent une virulence différente; toutefois, il est juste d'ajouter que plus un pneumocoque est virulent, moins on rencontre de différence entre les diverses colonies du même produit.

Ensemencement en milieu T. — C'est le cas du sang; culture massive d'où l'on isole ensuite 6 à 12 colonies, comme dans le cas précédent. Cette seconde technique

(1) La température de 35° convient également bien.

prête à la critique, car, au cours de la culture massive, les germes les plus vivaces prédominent certainement sur les autres. Elle n'a été employée que pour le sang, et encore uniquement lorsque les géloses ensemencées en même temps demeuraient stériles. Toutes ces remarques s'appliquent au titrage de la virulence; dans le cas de l'hémoculture, où le but est plutôt d'obtenir une culture que de déterminer exactement la virulence, on aura avantage, comme les pneumocoques sont peu nombreux dans le sang, à ensemencer le plus de sang possible (15-20 centimètres cubes) dans la plus grande quantité possible de milieu T; pour un titrage éventuel de la virulence, la culture directe du sang sur gélose, suivie de l'isolement de 6-12 colonies, serait plus correcte.

Inoculations.

On part, pour le titrage, de cultures en milieu T (24 heures à 37°). Des doses variées sont injectées dans les muscles gastro-cnémiens des souris. Si la dose dépassait 1/2 centimètre cube, mieux vaudrait inoculer sous la peau du dos, le liquide risquant dans le cas précédent de passer dans le péritoine, très proche. On suit l'évolution de la maladie expérimentale, et à l'autopsie, on note les lésions et s'assure de la présence (exclusive) et de l'abondance du pneumocoque dans le sang et dans les organes. Avant d'affirmer qu'il est absent, on doit faire des cultures. Quand on désire conserver le germe, pour des passages par l'animal par exemple, le mieux est de choisir l'encéphale comme semence. Cette technique, recom-

mandée par M. Nicolle, est applicable à toutes les affections septicémiques et surtout aux affections septicémiques des souris. Le cerveau constitue l'un des points du corps les plus tardivement envahis par les germes qui émigrent durant l'agonie ou après la mort. Comme cette émigration est d'autant plus rapide que les animaux sont plus petits, l'usage de l'encéphale s'imposait dans cette étude.

Le titrage de la virulence est complété par l'inoculation intra-musculaire au lapin (poids moyen : 2.000 grammes) et au cobaye (400 grammes). La dose de 1 centimètre cube (injection dans les muscles) est prise ici comme *unité de virulence*; les pneumocoques inactifs à cette dose sont donc arbitrairement déclarés « avirulents », expression défectueuse, en rigueur. Avec des doses plus élevées, (3 à 4 centimètres cubes), ou en employant des modes d'inoculation sévères (voies pleurale, péritonéale, pulmonaire, testiculaire), on accroît artificiellement le nombre des échantillons actifs, *mais fort peu*.

Il faut noter qu'on n'a pas fait ici mention de *l'inoculation directe à l'animal, des produits pathologiques*. C'est une méthode tentante par sa simplicité, mais souvent infidèle pour l'isolement du pneumocoque (et des autres microbes), et toujours condamnable pour le titrage de leur virulence. Examinons le cas, le plus simple, d'un produit qui contient le pneumocoque à l'état pur (certains pus par exemple). Si l'injection fait périr la souris, comment apprécier la virulence du pneumocoque, puisqu'on ne peut avoir aucune idée du nombre de germes inoculés? Qu'on titre la virulence des échantillons isolés du sang du cœur, c'est déjà un microbe modifié par l'organisme de la souris,

qu'on étudie. Si l'animal résiste, — le cas se présente plus souvent qu'on ne l'écrit, — les pneumocoques du pus étaient-ils morts? Ou vivants, trop rares ou trop affaiblis pour tuer? On a injecté en même temps des substances « anti »; leur ingérence peut masquer la virulence véritable. Dans un cas de méningite mortelle post-pneumonique que j'ai observé, le pus obtenu par ponction lombaire se montre à l'examen direct riche en pneumocoques. Plusieurs souris reçoivent chacune 1 centimètre cube sous la peau; un ensemencement est pratiqué sur gélose, 6 colonies repiquées en milieu T. Ces 6 cultures — milieu T tuent entre 30 et 50 heures à la dose de 1 centimètre cube; *les souris inoculées avec le pus résistent*. Est-il nécessaire d'ajouter que dans le cas d'un produit impur, les germes étrangers interviennent d'une façon impossible à apprécier, dans l'évolution de la maladie expérimentale? Toutes ces inconnues condamnent la méthode de l'inoculation directe.

Il existe fort peu de documents — justifiés par une technique rigoureuse — sur la virulence « au départ » des pneumocoques humains d'origine pathologique, pour la souris; les données sur la virulence pour le lapin sont fragmentaires, quasi-nulles pour le cobaye. Aussi résumerai-je dans 3 tableaux les résultats du titrage « au départ » chez 41 races que j'ai isolées chez des malades. Elles figurent toutes dans le premier tableau. Ensuite sont mentionnés dans les tableaux II et III les germes actifs sur le lapin et le cobaye.

TABEAU I. — Virulence pour la souris de 41 pneumocoques humains.

SIGNALEMENT DE L'ÉCHANTILLON	ORIGINE	DOSE MORTELLE POUR LA SOURIS DANS LES MUSCLES	SIGNALEMENT DE L'ÉCHANTILLON	ORIGINE	DOSE MORTELLE POUR LA SOURIS DANS LES MUSCLES
286	Crachat pneumonique Mort.	10 ⁻¹¹ c. cube (1)	D	Angine. Guérison.	1 c. cube
H (échantillon Aynaud <i>Ann. l. Pasteur</i> , 1911, p. 485).			163	Crachat pneumonique Guérison.	1 c. cube
	Crachat pneumonique Guérison.	10 ⁻¹⁰ c. cube	191 A	Sang d'un pneumonique. Guérison.	1 c. cube
			191 N	Sang du même malade	1 c. cube
287	Crachat pneumonique Mort.	10 ⁻¹⁰ c. cube	199 céphalo	Pus méningé voir 199 sang).	1 c. cube
292	Crachat pneumonique Guérison.	10 ⁻¹⁰ c. cube	208 sang	Sang d'un pneumonique. Guérison.	1 c. cube
306	Crachat pneumonique Mort.	10 ⁻¹⁰ c. cube	208 crachat	Crachat du même malade	1 c. cube
311	Crachat pneumonique Mort.	10 ⁻⁹ c. cube	279	Pus pleural. Pleurésie métapneumonique. Guérison.	1 c. cube
312	Crachat pneumonique Guérison.	10 ⁻⁷ c. cube	284	Pus méningé. Pneumonie et méningite Mort.	1 c. cube
169	Sang obtenu par ponction de la rate chez un pneumonique. Guérison.	10 ⁻³ c. cube	295	Pus d'abcès sous-cutané chez un malade atteint d'erythème polymorphe. Guérison.	1 c. cube
Merlier	Pus de panophtalmie (Serv. du Dr Morax).	10 ⁻² c. cube	301	Crachat pneumonique Guérison.	1 c. cube
199 sang	Sang d'un malade atteint de pneumonie et méningite. Mort.	10 ⁻² c. cube	308	Crachat pneumonique Guérison.	1 c. cube
298	Crachat pneumonique Guérison.	10 ⁻² c. cube	313	Pus d'otite chez un enfant.	1 c. cube
300	Crachat pneumonique Guérison.	10 ⁻² c. cube	297	Urine purulente.	1 c. cube ici, dans le péritoine
302	Crachat pneumonique Guérison.	10 ⁻² c. cube	216	Crachat pneumonique Guérison.	Avirulent.
Hôpital de la Pitié.	Crachat pneumonique Guérison.	10 ⁻¹ c. cube	230	Crachat pneumonique Guérison.	Avirulent.
Lausent sang	Sang d'un malade atteint de pneumonie et pleurésie purulente. Guérison.	10 ⁻¹ c. cube	235 sang	Sang d'un pneumonique. Guérison.	Avirulent.
			235 crachat	Crachat du même malade.	Avirulent.
Lausent plèvre	Pus pleural du même malade.	10 ⁻¹ c. cube	240	Sang du même malade	Avirulent.
288	Pus méningé. Ménigite mortelle.	10 ⁻¹ c. cube	296	Crachat pneumonique Guérison.	Avirulent.
304	Crachat pneumonique Guérison.	0,5 c. cube	308	Sang obtenu par ponction du poumon. Splénopneumonie. Guérison.	Avirulent.
A	Crachat pneumonique Guérison.	1 c. cube			
Gosset	Urine purulente.	1 c. cube			

$$(1) 10^{-11} \text{ c. cube} = \frac{1}{10^{11}} \text{ c. cube} = \frac{1}{100.000.000.000} \text{ c. cube.}$$

TABLEAU II. — Virulence pour le lapin,
de 9 pneumocoques humains.

SIGNALEMENT DE L'ÉCHANTILLON	ORIGINE	DOSE MORTELLE POUR LE LAPIN DANS LES MUSCLES	DOSE MORTELLE POUR LA SOURIS DANS LES MUSCLES
312	Crachat pneumonique Guérison.	10^{-8} c. cube	10^{-7} c. cube
286	Crachat pneumonique Mort.	10^{-7} c. cube	10^{-11} c. cube
306	Crachat pneumonique Mort.	10^{-7} c. cube	10^{-10} c. cube
311	Crachat pneumonique Mort.	10^{-3} c. cube	10^{-9} c. cube
Merlier	Pus de panophtalmie.	1 c. cube	10^{-3} c. cube
Hôpital de la Pitié	Crachat pneumonique Guérison.	1 c. cube	10^{-1} c. cube
H	Crachat pneumonique Guérison.	1 c. cube	10^{-10} c. cube
199 sang	Sang de malade atteint de pneumonie et méningite. Mort.	1 c. cube	10^{-2} c. cube
287	Crachat pneumonique Mort.	1 c. cube	10^{-10} c. cube

Comme le montre la lecture de ces tableaux, qui résument un nombre considérable d'expériences, *la virulence pour la souris des pneumocoques humains isolés chez les malades est très variable*. La dose mortelle oscille de 1 centimètre cube à $1/10.000.000.000$ centimètre cube; de plus, certains échantillons sont inactifs à 1 centimètre cube. Si l'on considère seulement les germes isolés chez des *pneumoniques* (sang, crachats, pus pleural,

TABLEAU III. — Virulence pour le cobaye, de
4 pneumocoques humains.

Signalement de l'échantillon.	Origine.	Dose mortelle pour le cobaye, dans les muscles.	Dose mor- telle pour le lapin, dans les muscles.	Dose mor- telle pour la souris, dans les muscles.
312	Crachat pneumo- nique. Guérison.	10 ⁻¹¹ c. cube	10 ⁻⁸ c. cube	10 ⁻⁷ c. cube
286	Crachat pneumo- nique. Mort.	1 c. cube	10 ⁻⁷ c. cube	10 ⁻¹¹ c. cube
306	Crachat pneumo- nique. Mort.	1 c. cube	10 ⁻⁷ c. cube	10 ⁻¹⁰ c. cube
H	Crachat pneumo- nique. Guérison.	(ici, 4 c. cubes sont nécessaires).	1 c. cube	10 ⁻¹⁰ c. cube

méningé, périnéphrétique) et ne compte que pour un les échantillons différents isolés chez le même malade, les peu virulents constituent la majorité. Sur 28, 4 ne tuent pas la souris à 1 centimètre cube; 12 (peu virulents) entre 1/2 et 1/10 centimètre cube; 5 (moyennement virulents) entre 1/100 et 1/1.000 centimètre cube; 7 (très virulents) entre 1/10.000.000 et 1/100.000.000.000 centimètre cube.

La virulence pour le lapin et le cobaye se présente sous un aspect différent. C'est une propriété plus rare chez le pneumocoque que la virulence pour la souris, et les conclusions suivantes me paraissent bien exprimer l'orientation générale des résultats :

1° Les pneumocoques humains se montrent rarement

virulents chez le lapin, exceptionnellement très virulents.

2° Les pneumocoques très actifs pour le lapin sont toujours très actifs pour la souris; les pneumocoques peu actifs pour le lapin, offrent au regard de la souris une activité variable. (Une minorité de pneumocoques tuant la souris tue le lapin.)

3° Les pneumocoques très actifs pour la souris peuvent être peu actifs pour le lapin; les pneumocoques moyennement ou peu actifs pour la souris sont généralement inactifs pour le lapin.

4° Les pneumocoques humains se montrent exceptionnellement virulents pour le cobaye, et cette virulence reste toujours faible.

5° Les pneumocoques actifs pour le cobaye sont toujours très actifs pour la souris et toujours actifs pour le lapin; *la réciproque n'est point vraie.*

Pour achever de fixer les idées, j'ajouterai que sur 41 races d'origine humaine pathologique (pneumoniques et autres), 34 tuent la souris (à la dose de 1 centimètre cube dans les muscles, ou une dose inférieure), 9 tuent le lapin parmi ces 34; parmi les 9 précédents, 4 seulement tuent le cobaye. Il existe donc une échelle de la virulence à 3 échelons : la majorité des pneumocoques ne dépassent pas le premier.

Je n'ai pas eu le loisir d'étudier un nombre aussi élevé d'échantillons d'autres provenances. A signaler les pneumocoques n° 297 et Gosset isolés d'urines purulentes (leur forme anormale est mentionnée au premier chapitre); trois autres isolés respectivement du pus d'une otite chez un enfant, du pus d'un abcès fessier chez un malade

atteint d'érythème polymorphe, d'une angine. Tous les cinq ne tuaient la souris qu'à 1 centimètre cube.

L'échantillon Merlier, dû à l'obligeance du Docteur Morax, provenait d'une panophtalmie et était doué d'une virulence notable (doses mortelles : 1 centimètre cube pour la souris, 1/100 centimètre cube pour le lapin). M. Morax (1) lui-même a décrit en 1894 une forme rare, bénigne, de conjonctivite pneumococcique chez les jeunes enfants, où les germes tuaient la souris en 18-24 heures à la dose d'un demi-centimètre cube. On trouvera dans les thèses de P. Petit (2) et de Mlle Bourg (3) des indications bibliographiques et des données personnelles sur la virulence du pneumocoque dans les affections oculaires. Il y aurait lieu d'approfondir ces études, faites sur la souris, en les étendant au lapin, et surtout en titrant la virulence sur plusieurs colonies isolées du même produit : il semble que la virulence soit plus élevée dans les affections oculaires profondes que dans les affections superficielles.

(1) Thèse de Médecine, Paris, 1894.

(2) Thèse de médecine, Paris, 1900.

(3) Thèse de médecine, Paris, 1909.

CHAPITRE IV

RAPPORTS ENTRE LA VIRULENCE ET PLUSIEURS AUTRES PROPRIÉTÉS DES PNEUMOCOQUES

Les échantillons *franchement virulents* se distinguent de la masse des autres par d'autres caractères que leur action pathogène. Il arrive souvent, lorsqu'on isole un pneumocoque d'un crachat rouillé par exemple, de prévoir avant toute inoculation qu'il jouira d'une forte activité au regard de l'animal. Presque toujours ces germes virulents fournissent en milieu T des cultures *peu abondantes*; la « maigreur » s'oppose à la « richesse » habituelle des pneumocoques ordinaires. Rien de surprenant à ce que la végétabilité *in vitro* soit en raison inverse de la virulence, véritable végétabilité *in vivo*. Les microbes virulents sont par définition spécialisés et souvent s'adaptent avec difficulté à la vie dans les milieux de culture. Les échantillons II, 286, 287, 306, 292, de provenance humaine, ceux qui ont été isolés chez des animaux par MM. Jouan, Cesari, Alleaux (voir plus loin), entrent dans cette catégorie : ils tuent la souris, presque toujours le lapin; les tableaux

des chapitres III et VI donnent des doses souvent très faibles.

Ce sont ces pneumocoques qui poussent mal ou pas du tout dans le premier tube de milieu T, où l'on repique les colonies isolées sur gélose; c'est pour eux principalement qu'il a fallu recourir au milieu-ascite, pour la première culture liquide. A côté d'eux se rangent des pneumocoques virulents, dont les premières cultures *seules* sont maigres, et qui ensuite s'adaptent rapidement à la vie saprophytique, fournissant des cultures assez abondantes ou même riches (169, 279, 298, 299). Les pneumocoques très virulents donnent donc en général des cultures-milieu T maigres; la réciproque n'est pas toujours vraie, d'autres causes, nombreuses, pouvant intervenir dans la richesse d'une culture. Dans le même ordre de faits, les pneumocoques qui donnent d'emblée, dès « le départ », des cultures abondantes, ont rarement une virulence marquée.

Ces germes « maigres » sont en général *fragiles*; les repiquages de milieu T comme de gélose, même si les cultures sont conservées à la température ordinaire, peuvent échouer, tandis que certains échantillons peu virulents sont repiqués avec succès après de longs mois.

Une troisième propriété, beaucoup plus importante, de la plupart des pneumocoques virulents, est leur *solubilité dans la bile*. Neufeld (1) découvrit en 1900 qu'une culture de pneumocoques, additionnée de bile de lapin (1 — 2 centimètres cubes de culture + 0 c. cube 1 de bile) s'éclaircit en quelques minutes. Les germes se dissolvent : l'examen

(1) *Zeitsch. f. Hyg.*, 1900, tome 34, p. 454.

microscopique, les cultures, les inoculations sont négatifs. Les biles d'homme, de chien, de chat, de chèvre sont moins actives que la bile de lapin. La bile de cobaye est très active. Ce phénomène n'est pas accéléré à la température de 37°; il est retardé à 0°; il ne se produit pas sur les cultures chauffées. Neufeld a vacciné le lapin avec des pneumocoques dissous par ce procédé.

M. Nicolle et Adil Bey (1) ont repris l'étude du phénomène de Neufeld. Ils ont recherché l'action de différentes solutions de sels biliaires. Le plus actif est le choléate de soude. Moins actifs sont le chénocholate de soude (Grübler), le choléate (Merck), le taurocholate (Grübler), le glycocholate. L'hyocholate est inactif. Parmi les autres bactéries usuelles, trois sont légèrement sensibles à l'action de la bile (choléra des poules, morve, peste), et leur dissolution est favorisée par l'adjonction de sels alcalino-terreux, sulfate de magnésie par exemple. Les vibrions cholériques, le bacille typhique, le coli, le charbon, le pyocyanique, le pneumobacille sont plus résistants; le streptocoque, le staphylocoque sont réfractaires.

Cette propriété du pneumocoque devait être utilisée pour son diagnostic. Levy (2), essayant de trouver des caractères différentiels entre les pneumocoques et les streptocoques, propose comme seules valables les épreuves de l'inoculation et du taurocholate. Sur 6 pneumocoques, 11 streptococcus mucosus, 24 streptocoques, ces derniers seuls étaient insolubles. Les pneumocoques se dissolvaient ainsi que les streptococcus mucosus. Ces der-

(1) *Ann. I. Pasteur*, 1907, p. 20.

(2) *Virch. Archiv*, 1907, p. 327.

niers germes sont considérés, comme on sait, par beaucoup d'auteurs, comme une variété de pneumocoques. Libman et Rosenthal (1) aboutissent à des conclusions de même ordre sur la valeur de ce critérium.

On pourrait croire que la solubilité dans la bile est une propriété commune à tous les échantillons de pneumocoque. Il n'en est rien; mais pour être inconstante, elle n'en est pas moins importante. Voici maintenant comment se comportent vis-à-vis de la bile les différents échantillons étudiés dans ce travail.

Technique. — Ajouter à 1 centimètre cube d'une culture en milieu T, âgée de 24 heures, III gouttes du mélange (bile de lapin + glycérine àà). La glycérine est employée pour la conservation. Lorsque l'épreuve est positive, la culture s'éclaircit complètement en moins d'un quart d'heure, à la température ordinaire.

Résultats. — Sur 31 races de streptocoques examinées, toutes se sont montrées insolubles. Sur 52 races de pneumocoques, 20 sont solubles, 32 insolubles. La liste détaillée me paraît intéressante à donner ici.

On voit que tous les pneumocoques ne sont pas solubles dans la bile, qu'il existe en outre, — point particulièrement important, — *des rapports entre la virulence et la solubilité dans la bile*. Voici ce que je peux conclure des différentes expériences :

1° La plupart des pneumocoques actifs sur le lapin (et *a fortiori* ceux qui sont actifs sur le cobaye) sont solubles dans la bile. La proposition inverse serait inexacte.

2° Les pneumocoques inactifs sur la souris sont insolu-

(1) *Proceed. N. Y. pathol. Soc.*, t. VIII, 1908.

Épreuve de la bile (1)

20 : SOLUBLES

32 : INSOLUBLES

SIGNA- LEMENT	DOSE MORTELLE		SIGNALEMENT	DOSE MORTELLE		SIGNALEMENT	DOSE MORTELLE		DOSE MORTELLE
	souris	lapin		souris	lapin		souris	lapin	
286	10^{-11}	10^{-7}	Lausent plèvre	10^{-4}		199 sang	10^{-2}	1	1
H	10^{-10}	1	288	10^{-1}		300	10^{-2}		216
287	10^{-10}	1	208 crachat	1		302	10^{-2}		230
292	10^{-10}		191 A	1		Hôp. de la Pitié	10^{-1}	1	235 crachat
306	10^{-10}	10^{-7}	303	1		304	1/2		240 sang
311	10^{-9}	10^{-3}	307	non titré « au départ »	1	A	1		296
						Gossel	1		308
312	10^{-7}	10^{-8}	299	10^{-6}	10^{-6}	D	1		255
169	10^{-3}		Jouan	10^{-3}	1	163	1		270
Merlier	10^{-2}	1	Cesari	1	10^{-1}	191. N	1		223
298	10^{-2}		Alleanx	1	10^{-1}	199 céphalo.	1		Cheval
						208 sang	1		Cobaye n° 2
						284	1		Cobaye n° 5
						295	1		Cobaye n° 8
						301	1		315 bœuf
						313	1		316 ver-à-soie

(1) L'épreuve a été faite sur les cultures « au départ ». Les échantillons soulignés tiennent seuls le lapin (1 centimètre cube dans les muscles, ou moins). Là où la dose n'est pas inscrite, l'animal résiste à 1 centimètre cube.

bles. Les pneumocoques moyennement actifs ou très actifs (1 : 100 à 1 : 10.000.000.000 centimètre cube) sur la souris sont solubles. Les pneumocoques peu actifs sur la souris (1 centimètre cube à 1 : 100 centimètre cube) sont solubles ou insolubles.

3° Chez un même échantillon, la solubilité dans la bile peut varier. Il s'agit alors de races moyennement ou peu actives sur la souris (les pneumocoques très virulents conservent en général leur virulence et leur solubilité). La solubilité dans la bile peut disparaître et la virulence se conserver. Si la virulence apparaît ou réapparaît (1), la solubilité peut ou non se montrer en même temps.

Le pneumocoque Gosset, isolé d'une urine purulente, présentant les anomalies de forme citées dans le premier chapitre, a manifesté des variations parallèles entre son activité sur les souris et sa solubilité dans la bile. Conservé à 0° dans la gélatine suivant un procédé indiqué plus loin, ce microbe était chaque mois repiqué sur milieu T; puis cette culture était en partie utilisée pour obtenir une culture-fille qu'on soumettait à l'épreuve de la bile, et dont on titrait la virulence. On peut suivre ainsi, pendant plusieurs mois, les variations des deux propriétés. (Voir tableau, page 47).

La solubilité dans la bile est donc un caractère d'une double signification; il paraît propre à l'espèce pneumocoque, et lié à un degré élevé de virulence. Neufeld dit n'avoir observé qu'un pneumocoque insoluble dans la bile, quoique typique. Or ce germe tuait la souris, mais ni le lapin, ni le cobaye : cette exception s'explique parfaite-

(1) On verra plus loin que la virulence ne demeure pas toujours telle qu'« au départ ».

ment par les résultats des recherches que je viens d'exposer. En présence d'un microbe tuant le lapin, l'épreuve de la bile pourrait au besoin trancher définitivement un diagnostic hésitant entre pneumocoque et streptocoque. Il faut ajouter que les cas où l'on est le plus embarrassé se rapportent aux germes absolument inactifs sur les animaux, et alors le critérium de la solubilité de la bile fait défaut, même pour les pneumocoques.

Date de l'épreuve.	Dose mortelle pour la souris dans les muscles.	Épreuve de la bile.
1910. — Juillet, « au départ »	1 c. cube. Mort en 3 jours 1/2	Insoluble
Octobre	Avirulent	Insoluble
Octobre 1910 à Mars 1911	Avirulent	Insoluble
1911. — Mai	10^{-3} c. cube. Mort en 2 jours	Soluble
Juin	10^{-3} c. cube. Mort en 40 h.	Très soluble
Juillet	10^{-3} c. cube. Mort en 40 h.	Soluble

On vient de voir comment se rencontrent associées, chez les pneumocoques franchement actifs, la virulence d'une part, et d'autre part la maigreur, la fragilité, la solubilité des cultures. Existe-t-il aussi des rapports entre la virulence pour l'animal et la gravité des infections pneumococciques chez l'homme? Posons le problème avec

plus de précision. La notion de l'activité d'un pneumocoque vis-à-vis de la souris et du lapin peut-elle influencer sur le pronostic de la pneumonie et dans quelle mesure? Inutile de développer l'intérêt de ce problème, commun à toutes les maladies microbiennes : je l'ai envisagé avec attention chez tous les pneumoniques rencontrés.

Il y a lieu de discerner d'abord *la virulence pour la souris*. Dans les cas où elle est fort accentuée, l'animal succombe à l'inoculation de doses comprises entre $1/10.000.000$ et $1/100.000.000.000$ centimètre cubé, et en pratique, au moins, on est autorisé à les considérer comme équivalentes. Le tableau I^{er} (3^e chapitre) montre plusieurs échantillons de cette activité : 286, 287, 306, 311, 292, H, 312, tous isolés de crachats rouillés dans des pneumonies à la période d'état, sans complications extra-pulmonaires. Les quatre premiers correspondent à des cas mortels, les trois autres à des cas terminés par guérison. Même il faut ajouter que dans certains de ces derniers, l'intensité modérée de la maladie ne permettait pas de supposer une virulence aussi forte. Je pourrais rapporter avec force détails ces observations cliniques; mais il s'agit de malades d'âge, de sexe, d'antécédents pathologiques fort différents, permettant de supposer chez eux des degrés nullement comparables de résistance. C'est cette diversité de résistance chez les malades qui impose la prudence dans la confrontation des observations cliniques. On est amené — exactement comme pour le titrage de la virulence, — à appeler graves les infections mortelles, alors que les infections terminées par guérison sont d'une intensité fort inégale.

En dehors de ces 7 échantillons très virulents, les 21 autres étaient moyennement ou peu actifs sur la souris (1 centimètre cube à 1/1000 centimètre cube); quelques-uns inactifs. Sur les 21 pneumoniques correspondants, 3 sont morts de méningite, leurs pneumocoques (199, 284, 288) tuant la souris entre 1 centimètre cube et 1/100 centimètre cube. Les 18 autres malades ont guéri, quelquefois malgré des complications sérieuses (pleurésie purulente, néphrite aiguë suivie de phlegmon périrénal, orchite), sans que leurs germes fussent doués d'une virulence accusée. Il n'existe donc pas de rapport nécessaire entre la gravité d'une pneumonie et la virulence des pneumocoques pour la souris.

Par contre certains rapports ressortent de cette étude, entre la gravité de la pneumonie et la virulence des germes pour le *lapin*. Rien d'illogique, puisque les pneumocoques actifs sur le lapin sont d'essence virulente. Sur 8 échantillons de cette sorte, 4 furent isolés dans des pneumonies mortelles sans déterminations extra-pulmonaires (286, 287, 306, 311, déjà cités). 199 provient du sang d'un pneumonique qui succomba à une méningite. Aux 3 cas guéris correspondent les échantillons H, 312, Hôpital de la Pitié : une des trois malades contracta quelques jours après l'accouchement, une pneumonie d'allures très sévères (1) et (2). — Si, d'autre part, je passe en revue

(1) Je remercie MM. Morax, Pinoy, Magrou, Aynaud et mes collègues P. L. Marie, Dumont, Levy, Delivet, des échantillons qu'ils ont bien voulu me remettre.

(2) Un autre échantillon (307), soluble dans la bile, tuait le lapin à 1 centimètre cube. Il provient des crachats d'un pneumonique qui guérit contre toute attente, la maladie ayant revêtu un aspect fort inquiétant. Il n'est pas mentionné dans les tableaux, le titrage de sa virulence « au départ » ayant été omis chez la souris.

les cas mortels, où la virulence a été recherchée, sur 7 cas, 5 fois le pneumocoque tuait le lapin, souvent à doses très faibles (1/10.000.000 centimètre cube); 2 fois, les lapins ont résisté (284 et 288); les deux germes avaient été isolés du pus méningé. Le tableau suivant figure l'activité des échantillons dans les cas mortels :

Signalement.	Dose mortelle pour la souris (dans les muscles).	Dose mortelle pour le lapin (dans les muscles).
199 sang	10^{-2} c. cube $= \frac{1}{100}$ c. cube	1 c. cube
286	10^{-11} c. cube	10^{-7} c. cube
287	10^{-10} c. cube	1 c. cube
306	10^{-10} c. cube	10^{-7} c. cube
311	10^{-9} c. cube	10^{-9} c. cube
284	1 c. cube	Avirulent
288	10^{-4} c. cube	Avirulent

Sur 3 pneumocoques tuant le cobaye, 2 provenaient de pneumonies mortelles (286,306); le dernier (312) vient d'être mentionné.

En résumé, après avoir étudié parallèlement les malades et les germes fournis par eux, il me semble qu'on peut conclure ainsi. Le titrage de la virulence par l'inoculation de plusieurs colonies — seule technique rigoureuse — ne

fournit de renseignements qu'au bout de plusieurs jours, à une époque où la pneumonie s'est quelquefois jugée; aussi cette technique ne saurait-elle *pratiquement* aider au pronostic des pneumoniques. Cependant les résultats n'en sont pas moins intéressants. Une forte virulence pour la souris, jointe surtout à une virulence évidente *et a fortiori* marquée pour le lapin (encore plus pour le cobaye), constitue une sérieuse présomption en faveur d'une *activité* notable au regard de l'organisme humain — (et une *quasi-certitude* quand il s'agit de malades sans tares ni infections antérieures). Lorsqu'on est en présence d'un pneumocoque tuant le lapin, le pronostic sera réservé, même si les allures cliniques de l'affection sont rassurantes.

Ainsi formulées, ces conclusions ne dépassent pas les faits. Mais les rapports qui relient la virulence des germes pour l'animal à la gravité des infections humaines de même nature intéressent assez médecins et bactériologues pour qu'il soit permis de revenir sur ce problème. On remarquera que jusqu'ici il a été question de *gravité d'infection chez l'homme*, et jamais de *virulence pour l'homme*. C'est qu'en effet la virulence pour l'homme est difficile à concevoir, parce qu'elle sera toujours impossible à mesurer. Peut-on conclure de la virulence d'un pneumocoque pour la souris à sa virulence pour l'homme? Évidemment *non*. Quand on inocule des souris, soigneusement choisies et aussi semblables que possible, avec des pneumocoques différents, la résistance des animaux peut être considérée, *grosso modo*, comme constante (l'expérience justifie cette approximation), et l'intensité de l'infection mesure bien,

somme toute, le degré de la virulence. Un titrage parallèle avec des *hommes sains* étant naturellement impossible, comment établir une base de comparaison entre la virulence pour la souris et la virulence pour l'homme?

Chez les *individus malades*, la résistance varie d'un cas à l'autre, et la virulence également. Nous n'observons que leur rapport, exprimé par le tableau clinique, et c'est ce rapport *seul* qui dicte, en réalité, le pronostic au médecin. Chez un pneumonique, nous possédons fort peu de données sur la grandeur des forces dont le conflit constitue la maladie. Nous observons bien une certaine intensité de l'infection, et c'est tout; il nous 'échappera toujours la virulence des germes en cause, et la résistance du malade. Allons plus loin : lors même que cette dernière serait connue, nous ne pourrions guère déduire la virulence. C'est qu'en effet une autre notion nous fait défaut : la *quantité* de germes virulents avec laquelle le malade est aux prises. On ne pourrait pas davantage estimer la virulence d'un pneumocoque dont on aurait inoculé des doses indéterminées à la souris. D'ailleurs combien de différences séparent la septicémie de la souris, déterminée par une quantité connue de germes, et la pneumonie, affection toute différente par ses lésions, son évolution cyclique, sa marche vers la guérison ou vers la mort, se jouant de toute thérapeutique ! Même aujourd'hui, avec ce qu'on sait du pneumocoque, le problème de l'étiologie est loin d'être résolu et nous ne savons rien de ce « *primum movens* » qui met en branle les germes dans l'organisme. Il n'y a pas moins de différences entre la pneumonie et la septico-pyohémie expérimentale du lapin et du cobaye.

D'ailleurs, puisque les termes *septicémie* et *pyohémie* se rencontrent nécessairement dans cette étude, voyons comment elles ne s'appliquent pas à la pneumonie humaine.

Nombre d'auteurs ont recherché le pneumocoque dans le sang des pneumoniques pendant la vie. La présence de ce microbe dans la circulation fut considérée d'abord comme rare; on pensait que chez les seuls pneumoniques gravement atteints, des germes quittant le foyer pulmonaire envahissent le sang. Depuis les premières recherches, d'autres auteurs auraient trouvé l'hémoculture positive chez presque tous leurs pneumoniques, même en n'employant que des techniques usuelles. Sous l'influence de ces travaux s'est fait jour une conception erronée; d'après elle, la pneumonie serait une sorte de septicémie à marche cyclique, avec localisation pulmonaire; on la désigne sous le nom de « septicémie diplococcique » dans des ouvrages classiques. Cette étude de clinique et de bactériologie entreprise chez de nombreux malades amène à une opinion différente, plus voisine de l'ancienne. Signalée déjà dans un précédent mémoire (*Annales de l'Inst. Pasteur*, 1911, juin), elle se confirme ici par l'exposé de nouveaux résultats.

Les malades dont j'aiensemencé le sang présentaient le tableau de la pneumonie lobaire terminée par une crise ou par la mort; ainsi se trouvaient éliminées les maladies pulmonaires à pneumocoques dont la marche n'est pas cyclique. L'hémoculture présentait un intérêt surtout théorique; rarement j'ai vu ses résultats lever une hésitation ou redresser un diagnostic erroné. La valeur pratique de ce procédé dans la pneumonie est certainement plus faible que dans d'autres maladies, fièvre typhoïde en particu-

lier : la rareté des résultats positifs, la prédominance rapide des symptômes « thoraciques » rend son emploi souvent superflu chez les pneumoniques.

La *technique* suivante a été employée : 5 à 20 centimètres cubes de sang, en moyenne 15 centimètres cubes, étaientensemencés (1) sur 80 à 200 centimètres cubes de milieu T (eau, 100; peptone Chapoteaut, 4; sel 0,5; glucose 0,2). Culture à 37°, repiquages après 24 heures, puis tous les 2 jours, sur milieu T et gélose. L'emploi parallèle des autres milieux préconisés par les auteurs ne m'a pas fourni de meilleurs résultats; aussi m'en suis-je tenu au milieu T, qui convient parfaitement à l'étude des pneumocoques.

En présence des premiers résultats négatifs, j'ai tenté en même temps l'*hémoculture au niveau du doigt*, sans plus de succès. Quelquefois, résultats positifs alors que le sang du coudeensemencé en quantité beaucoup plus grande, demeurait stérile. La *ponction de la rate* m'a fourni du pneumocoque dans un cas où la culture du sang du coude était négative. L'*inoculation directe du sang à la souris*, préconisée par certains auteurs, est infidèle; les germes avirulents qu'on isole quelquefois du sang pneumonique passent ainsi inaperçus; même il arrive que la souris résiste à l'inoculation directe d'un demi-centimètre cube de sang, et qu'elle succombe à l'inoculation de 1 centimètre cube de culture du pneumocoque contenu dans ce même sang.

Voici les *résultats obtenus*. — Sur 35 pneumoniques (7 enfants et 28 adultes), le pneumocoque a été rencontré

(1) Quelquefois additionnés à quantités égales d'une solution aqueuse à 6 p. 1.000 de citrate de soude.

dans le sang de 10 malades; 25 fois, les cultures sont demeurées négatives. Chez plus d'un tiers des sujets, ce sont 2 ou 3 hémocultures qui ont été pratiquées pendant le cycle de la maladie. Ces chiffres indiquent une proportion faible de cas positifs, mais ils résultent d'un nombre suffisant d'examens pratiqués à des époques variées de l'année, à des jours variés de la maladie, pour ne laisser aucun doute sur leur exactitude. Ces résultats rappellent d'ailleurs ceux de statistiques plus anciennes (Widal, Lemierre et Gadaud, *Soc. des hôp.*, 3 avril 1903). Ma statistique, pas plus que les autres, ne donne d'ailleurs aucune idée de la *quantité* de germes contenus dans le sang; le hasard de l'ensemencement fait que quelques germes fournissent à eux seuls une culture. Il serait indispensable d'être fixé sur l'ordre de grandeur de cette quantité, avant de prononcer le mot septicémie. Je n'ai pas institué de recherches sur ce point particulier, mais les résultats de certaines hémocultures sur milieux solides permettent de prévoir que le pneumocoque existe en petite quantité dans le sang. Dans un cas, sur 13 tubes de gélose où sont également repartis 4 centimètres cubes de sang, 6 tubes seulement donnent des cultures. Chez un autre malade, 1 seul tube sur 10 ensemencés avec 4 centimètres cubes de sang, etc. De deux hémocultures faites en même temps au coude et au doigt, souvent une seule est positive. On objectera que les pneumocoques pullulent peut-être dans le sang, mais qu'une fois extraits de l'organisme, ils meurent sans pouvoir s'adapter aux conditions de la culture *in vitro*. C'est sans doute le cas d'un certain nombre, mais si le pneumocoque était très abon-

dant dans le sang des pneumoniques, quelques germes se trouveraient sûrement plus aptes à la culture, et on en rencontrerait quelquefois à l'examen microscopique direct du sang.

Existe-t-il donc, au cours de la pneumonie, une « septicémie » véritable? Depuis quatre-vingts ans environ que ce mot a été introduit dans le langage médical, les auteurs ont toujours discuté sur sa signification. Dans le principe, il exprimait une altération du sang par des matières septiques ou putrides résorbées au niveau des plaies; réunissant tous les accidents aigus post-opératoires infectieux, redoutés des chirurgiens, ce terme s'appliqua peu à peu aux maladies médicales à forme sévère adynamique (fièvre typhoïde, etc.); toujours un pronostic fatal était lié à son emploi. On parle aujourd'hui de septicémie quand on suppose le sang envahi par des microbes. Cette dernière condition n'est pas suffisante et, à ce titre, combien de maladies infectieuses rentreraient alors dans le cadre de la septicémie? La septicémie, semble-t-il, correspond à un état très spécial et heureusement rare de l'organisme. Le sang est envahi rapidement par des germes qui s'y multiplient aussi bien que dans un milieu de culture. Que cet envahissement des humeurs résulte d'une virulence exagérée ou d'une résistance affaiblie, peu importe; un pareil état de l'organisme ne saurait se prolonger sans dommage pour lui. Ou bien une crise amène brusquement la destruction des germes circulant (paludisme, fièvre récurrente), ou bien l'organisme succombe. L'autopsie témoigne de la réaction minime des organes : congestion des viscères, hypertrophie de la rate, sang

« dissous ». En clinique, pas de signes locaux, mais des symptômes généraux, le tableau de l'ancienne septicémie des blessés, de certaines formes d'infection puerpérale ou d'endocardite : fièvre élevée, frissons, pâleur et prostration extrêmes, respiration anxieuse, pouls rapide et filiforme, euphorie terminale, terminaison par syncope ou coma. Dans les formes habituelles de la pneumonie, le tableau est tout différent. On est frappé avant tout par la prédominance des signes locaux pulmonaires : point de côté, dyspnée, expectoration ; elle est le type de la maladie *inflammatoire*, les symptômes de bactériémie ou même de toxhémie viennent au second plan. Bien que la pneumonie soit autre chose que l'hépatisation d'un lobe pulmonaire, l'importance de cette lésion locale explique les troubles considérables observés dans la respiration et la circulation ; enfin, la maladie évolue « théoriquement » vers la guérison ; le vieillard, dont la résistance est affaiblie, les pneumoniques qui rencontrent des pneumocoques particulièrement toxiques restent l'exception. On se représenterait volontiers la véritable septicémie à pneumocoques, probablement rare, sous des allures cliniques infiniment plus sévères, rappelant celles d'une « fièvre adynamique : » son évolution serait nécessairement fatale à bref délai. L'évolution clinique, les lésions observées dans la septicémie à pneumocoques de la souris — mises à part les différences d'espèce — font entrevoir la séparation radicale qui existe entre la pneumonie et une septicémie véritable. Dans le même sens plaident les résultats de l'hémoculture ; sans doute, des pneumocoques sont perpétuellement lancés dans le sang, puisque la ponction les

retrouve dans les viscères (foie, rate), mais quel rapport existe entre eux et les germes innombrables du sang, dans une vraie septicémie (charbon, par exemple), aussi nombreux que les globules rouges?

L'étude des cas où j'ai rencontré le pneumocoque dans le sang n'en est que plus intéressante. Ces 9 cas positifs se répartissent ainsi : 2 cas mortels (encore l'évolution du second est anormale) et les cas terminés par guérison.

1^o K., homme de 58 ans, alcoolique. Artério-sclérose accentuée. Pneumonie du sommet gauche, suppurée. État général grave, température dépassant 40°, délire, soubresauts des tendons. Hémoculture le 3^e jour. Mort le 5^e jour.

2^o M..., homme de 60 ans. Pneumonie suivie au bout de quelques jours d'une méningite purulente à pneumocoques. Hémoculture la veille de la mort.

3^o G..., garçon de 6 ans. Pneumonie gauche massive, avec prédominance des symptômes inflammatoires. Crise le 6^e jour.

Guérison rapide. Hémoculture le 5^e jour : négative avec le sang du coude; positive avec quelques gouttes de sang du doigt.

4^o S..., homme de 21 ans. Pneumonie droite massive; prédominance, comme dans le cas précédent, des symptômes, inflammatoires. Température : près de 40°, délire dès le début de la maladie. Crise typique le 7^e jour. Guérison rapide. Hémoculture le 4^e jour; sang du coude et sang du doigt fournissent du pneumocoque.

5^o L..., homme de 30 ans. Pneumonie gauche compliquée dès le 3^e jour de pleurésie purulente para-pneumonique. Guérison après empyème. Hémoculture négative le 2^e jour, positive le 4^e jour.

6^o M..., homme de 32 ans, sans aucun antécédent pathologique. Pneumonie ayant succédé à une chute sur le thorax. Terminaison normale par crise. Dans le cours de la maladie,

l'examen de l'urine montre en grandes quantités du glucose et de l'acétone ; pendant la convalescence, orchite, puis érysipèle spontanément guéris. Hémoculture positive le 3^e jour.

7^e L., homme de 39 ans. Pneumonie gauche, avec albuminurie de 3 grammes par litre, Crise imparfaite le 5^e jour. La fièvre reparait le 7^e jour, l'albuminurie atteint bientôt 12 grammes puis diminue, mais persiste encore un mois après le début de la maladie. A cette époque, abcès périnéphrétique à pneumocoques. Incision. Guérison. Hémocultures positives le 3^e et le 7^e jours, négative le 10^e jour.

8^e M..., homme de 20 ans. Pneumonie double ; symptômes généraux graves ; signes de défaillance cardiaque, cyanose. Guérison par crise franche. Hémoculture positive le 9^e jour, avant la crise.

9^e V..., homme de 42 ans. Pneumonie abortive ; symptômes critiques caractérisés dès le 2^e jour. Chute progressive de la température. Hémoculture positive le 9^e jour, contre toute attente (la température était de 36°7, le pouls de 70, la guérison semblait achevée.)

En résumé, sur ces 9 observations, une fois éliminés 2 cas mortels et 2 cas de pneumonie normale, il reste 5 cas, plus de la moitié, dans lesquels la maladie a évolué avec des symptômes particulièrement sévères, ou s'est compliquée de manifestations insolites. Pleurésie purulente parapneumonique, orchite, abcès périrénal, pneumonie double, pneumonie à marche abortive, la lecture de ces titres d'observations indique à elle seule que les malades ont été éprouvés par le pneumocoque d'une façon toute spéciale.

Pour les résultats positifs des hémocultures, il est probable qu'ils relèvent de deux catégories. Les uns sont sans doute dus à un simple hasard d'ensemencement ;

j'interpréterais ainsi volontiers les résultats des examens III et IV. Dans les autres cas, il est probable que, sans créer une septicémie véritable, — peut-être exceptionnelle et encore hypothétique, aujourd'hui même, dans les cas graves — les germes avaient tendance à envahir sans cesse la circulation. Dans le cas VII, deux hémocultures se montrent positives le 3^e et le 7^e jours; je n'ai pas observé pareil fait chez les malades atteints de pneumonie normale, dont le sang avait étéensemencé à deux ou trois reprises. La tendance à l'infection du sang s'exprime assez dans toutes ces observations par les *métastases*.

La présence du pneumocoque dans le sang est-elle plus fréquente, avant la crise? C'est probable, bien qu'on puisse l'observer après la crise (Obs. IX); mais les hémocultures sont trop souvent négatives même pendant la période fébrile pour qu'on puisse établir aucune règle. Bien plus, la présence en grandes quantités du pneumocoque dans le sang n'est pas toujours la règle dans les pneumonies mortelles; douze heures même avant la mort 10 centimètres cubes de sang peuvent rester stériles; j'ai observé ce fait dans plusieurs cas, notamment chez un homme dont la pneumonie s'était compliquée de méningite. Sur 5 cas mortels, 2 fois seulement l'ensemencement a été positif. Je n'insiste que pour montrer combien dans beaucoup de cas, même sévères, l'état du sang n'est pas nécessairement « septicémique ».

En résumé, une notion positive paraît se dégager de ces recherches. Le pneumocoque n'abonde pas dans le sang des pneumoniques pendant la vie; il se rencontre souvent — comme on pouvait le prévoir, — dans des cas depneu-

monies suivies de déterminations extra-pulmonaires. Sa présence, surtout notée dans plusieurs examens répétés du sang, quelle que soit la virulence pour les animaux, des germes isolés, quel que soit le tableau clinique, doit faire réserver le pronostic.

Un mot sur la virulence comparée des germes isolés dans le sang et les autres produits pathologiques du même malade (crachats, pus, etc.) Il ne m'a pas paru, contrairement à une opinion parfois soutenue, que les échantillons du sang fussent nécessairement plus pathogènes. Peut-être les faibles différences observées viendraient elles même à disparaître si l'on faisait le titrage pour un grand nombre de colonies. La virulence des pneumocoques du sang n'a jamais dépassé 1/1000 centimètre cube ; sur 8 cas, je relève une fois 1/1.000 centimètre cube, 2 fois 1/10 centimètre cube, une fois 1 centimètre cube ; 3 échantillons étaient même avirulents. Un seul tuait le lapin (199 sang). — Etant donné la rareté relative du pneumocoque dans le sang, il est difficile d'être fixé sur sa virulence respective avant et après la crise : pas de différence dans les très rares cas où j'ai obtenu deux résultats positifs d'hémoculture chez le même malade. La virulence des échantillons isolés de complications (pleurésie purulente, méningite ; Lausent plèvre, 279, 284, 288, 199 céphalo) était faible.

CHAPITRE V

ÉVOLUTION DE LA VIRULENCE EN DEHORS DE TOUT PASSAGE IN VIVO.

On a vu sous quel aspect se présente la virulence des pneumocoques qu'on vient d'isoler de l'organisme des malades, en un mot la virulence « au départ ». Le problème de technique qu'il faut résoudre dans toute étude systématique d'un virus, se présentait au début de ces recherches : réussir à conserver, pour l'étude, des cultures de pneumocoques vivantes et virulentes. Étant données des cultures virulentes pour les souris, conserver leur activité initiale vis-à-vis de ces animaux, *sans faire aucun passage par une espèce animale*. Cette dernière réserve est d'importance majeure : on ne saurait prévoir *a priori* les modifications qu'imprime peut-être à la virulence un passage par l'animal. Les nombreux passages dont le résumé sera fait au chapitre suivant ont été institués dans le but d'élucider leur influence sur la virulence, mais *jamais* dans le but particulier de la conserver.

Ce n'est pas que de nombreux procédés n'aient été proposés à cet effet. Presque toujours il a fallu « en passer » par la conservation dans des milieux additionnés d'humeurs

animales, bouillon-ascite par exemple, ou dans des humeurs elles-même : sang de lapin (Gilbert et Fournier), sang défibriné de lapin additionné d'ascite, (Bezançon et Griffon); la *fragilité* des cultures, dans les milieux usuels, bien caractéristique du pneumocoque, exigeait l'emploi de ces artifices. Jamais d'ailleurs le problème n'a été abordé systématiquement avec la volonté arrêtée de trouver une technique simple et sûre, capable de s'appliquer indifféremment à tous les échantillons. Les recherches que nous avons poursuivies, M. Truche et moi, nous ont amenés à l'emploi de la *gélatine* (procédé de M. Nicolle et Adil-bey pour la conservation du virus de la peste bovine); le procédé nous a donné pleine satisfaction.

Technique suivie.

Gélatine physiologique. — Gélatine, 150 grammes; sel 8 gr. 5; eau 1.000. Chauffer au bain-marie, pour dissoudre; refroidir à 55°; ajouter un blanc d'œuf; alcaliniser légèrement. Stériliser; filtrer; répartir; stériliser 20 minutes à 110°.

Voici le *double schéma* des expériences instituées pour établir la valeur du procédé. Il a été mentionné plus haut qu'on partait toujours pour le titrage de la virulence, d'une culture en milieu T (24 heures à 37°), culture-origine, la première en milieu liquide après la sortie du microbe, de l'organisme.

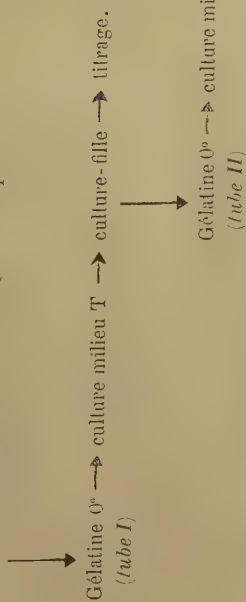
1^{re} SÉRIE D'EXPÉRIENCES. — De cette culture, il était fait 2 parts. L'une servait à titrer la virulence, l'activité des germes étant évaluée très exactement par injection dans les muscles des souris, à doses variées (1 centimètre cube

1/100, 1/1.000 etc.) L'autre, *n'ayant jamais passé par l'animal*, était destinée à la conservation. On la transportait dans un tube de gélatine physiologique liquéfiée à douce chaleur (gélatine, 2 parties; culture, 1 partie). Ce tube scellé, était gardé à la glacière. Le mois suivant, une partie du contenu du tube, liquéfiée, servait à ensemen- cer un tube de milieu T, d'où l'on tirait, par repiquage, une culture-fille en milieu T (1). Cette culture-fille était divisée en 2 parts : l'une pour le titrage de la virulence, l'autre ajoutée à un deuxième tube de gélatine, pour la conserva- tion à 0°. . . et ainsi de suite. Cette première suite d'expériences renseignait sur l'évolution de la *virulence des pneumocoques soumis à des passages mensuels en gélatine*.

2^e SÉRIE. — Les tubes de gélatine qui avaient servi à ensemen- cer, étaient chaque mois rescellés et replacés à la glacière. Après plusieurs mois, la série de ces tubes a servi à faire des cultures en milieu T, puis des cultures- filles en milieu T, dont on a titré la virulence. On con- naissait ainsi l'évolution de la *virulence des pneumocoques conservés en gélatine, sans subir aucun passage*. Le tableau ci-contre achèvera de fixer les idées.

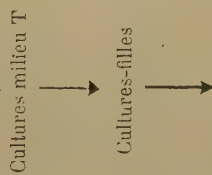
(1) Il est indiqué de faire cette seconde culture en milieu T pour inoculer les animaux; la culture précédente est trop riche en gélatine.

1^{re} série. — Passages mensuels en gélatine).
 Culture-origine milieu T → titrage « au départ ».



COTONI

2^e série. — (Pas de passages).
Tubes I, II, III, etc .. (Virulence titrée chaque mois dans la 1^{re} série).



(Dans cette série, les tubes I, II, III, etc... sont repris dans la glacière, après plusieurs mois).

3

Résultats obtenus.

Cette étude faite avec 20 échantillons de pneumocoques, (15 actifs « au départ » sur la souris, 5 inactifs) a nécessité des centaines de titrages (1), mais a fourni des résultats *très curieux* à certains égards. Ils se rapportent à la conservation de la virulence et de la vitalité.

1^o Virulence.

1^{re} série. — Sort de la virulence, au cours des passages mensuels en gélatine :

Les *pneumocoques très virulents* conservent indéfiniment leur activité. Les échantillons H, 286, continuent de tuer les souris, comme à l'époque de leur isolement, c'est-à-dire depuis plus d'un an, au dix-milliardième de centimètre cube.

Les 5 *pneumocoques avirulents* « au départ » (à la dose de 1 centimètre cube) se sont montrés capables de tuer les souris, après quelques passages *in vitro*, aux doses de 1 centimètre cube, 1 10 centimètre cube et même 1 100 centimètre cube, selon les échantillons. Ce résultat incontestablement inattendu ne doit pas être considéré comme entaché de mystère; la façon dont les expériences ont été conduites ne permet point davantage de le considérer comme entaché d'erreur. L'échantillon 230, pour citer un exemple, isolé d'un crachat rouillé, était avirulent (à la dose de 1 centimètre cube) aussitôt après l'isolement. Quatre mois plus tard, ayant quatre fois passé en gélatine,

1° Aussi cette étude de l'évolution de la virulence *in vitro* a été faite *exclusivement* sur des souris.

il tuait les souris aux doses de 1 centimètre cube et 1/100 centimètre cube.

Les *pneumocoques peu virulents* (1 centimètre cube à 1/100 centimètre cube) demeurent le plus souvent stationnaires; quelquefois ils augmentent d'activité, quelquefois ils fléchissent ou deviennent même temporairement inactifs; rarement on les voit perdre leur virulence, mais rien ne permet alors de conclure à une perte définitive. Dans ce groupe de germes peu virulents se trouve l'échantillon Gosset : « au départ », il tuait la souris (irrégulièrement) au centimètre cube; après trois mois, il devient avirulent et demeure longtemps tel; après dix mois, il tue les souris à la dose de 1/100 centimètre cube.

Les *pneumocoques de virulence moyenne* (1 à 1/1.000 centimètre cube) restent en général stationnaires ou n'offrent que des oscillations modérées de leur activité.

Par conséquent, les pneumocoques conservés à la glacière après addition de gélatine et repiqués chaque mois gardent, dans la règle, leur virulence pleine et entière; tout au plus, observe-t-on des fluctuations sans importance, qui paraissent d'ailleurs inconnues chez les échantillons très infectieux; *résultat essentiel au point de vue pratique.* — Une minorité de germes *oscille*, plus ou moins lentement, autour de notre zéro (survie après injection intra-musculaire de 1 centimètre cube). Parfois on suit l'oscillation tout entière (disparition et réapparition de la virulence (1)); parfois on n'en suit que la moitié (dispari-

1 C'est le cas de l'échantillon Alleaux. — Au départ — il tuait la souris à la dose de 1 centimètre cube; après 5 mois, à 1/10 centimètre cube; après 8 mois il était devenu avirulent.

tion ou apparition de la virulence). La pratique de la question impose cette conviction, qu'on *doit* considérer l'apparition de la virulence chez les pneumocoques inactifs « au départ » comme une réapparition pure et simple (ce qui enlève au phénomène toute allure mystérieuse) — et qu'on *peut*, par contre, douter du caractère définitif de la perte de la virulence chez les pneumocoques actifs tombés à zéro. (Une avirulence irrévocable n'aurait d'ailleurs aucun cachet énigmatique).

2^e SÉRIE. — Sort de la virulence des pneumocoques conservés en gélatine, sans passages mensuels.

Les *pneumocoques très virulents* conservent leur activité pendant au moins six mois ; les *pneumocoques peu virulents*, pendant au moins deux à trois mois ; les *pneumocoques moyennement virulents*, pendant un temps intermédiaire (1). D'une façon générale, les résultats se montrent donc « logiques ». Toutefois avec certains germes, peu actifs, de curieuses oscillations ont été notées, ici encore. *Exemple* : on prélève dans un tube conservé six mois : culture-fille inactive ; on prélève dans le même tube quatorze mois plus tard : culture-fille active. D'autres faits de même ordre démontrent clairement combien il serait imprudent d'affirmer le caractère définitif d'une perte de virulence.

2^e Vitalité.

Elle se conserve parfaitement bien par le procédé de la gélatine. Même sans repiquages mensuels, les pneumo-

(1) Certains échantillons se conservent virulents encore plus longtemps qu'il n'est mentionné ici.

coques peuvent ainsi rester vivants *deux ans* (au moins) à la glacière. A 37°, ils peuvent garder un an leur vitalité et souvent même deux ans. Comme il fallait s'y attendre, la virulence fléchit, dans la règle, bien plus à l'étuve qu'à la glacière; on observe quelquefois, il est vrai, de bien singulières exceptions, mais elles sont trop rares pour mériter une mention détaillée. En règle générale, la conservation à la glacière doit être recommandée de préférence.

CHAPITRE VI

ÉVOLUTION DE LA VIRULENCE AU COURS DES PASSAGES IN VIVO.

L'inoculation en série aux animaux est un procédé classique en bactériologie pour exalter l'activité des germes : aussi son usage s'imposait-il dans une étude sur la virulence des pneumocoques. Ce chapitre résume une suite très longue d'expériences. Commencées par M. Nicolle, elles ont été continuées par M. Truche avec d'autres échantillons et par moi-même : c'est l'ensemble des résultats, nécessairement résumés, que j'expose ici.

Technique des passages in vivo.

Une *culture-origine* en milieu T est inoculée, après 24 heures d'étuve, à un premier animal. Celui-ci étant mort, on ensemence son cerveau en milieu T, on place à 37° et, le lendemain, on prélève purement pour l'inoculation suivante. Le reste de la *culture-cerveau*, additionné de gélatine, est conservé dans la glacière. Et *ainsi de suite*, si un sujet vient à résister, on reprend la dernière culture-cerveau, on sème en milieu T et on inocule un autre animal.

Quand un germe fléchit au cours des passages, on voit le nombre des pneumocoques diminuer de plus en plus chez les derniers sujets qui succombent; parallèlement, les cultures-cerveau deviennent de plus en plus chétives et fragiles. Il faut alors remonter progressivement dans la série de ces cultures (conservées à la glacière), pour tenter de renouer le fil de l'expérience. Lorsque plusieurs essais consécutifs demeurent infructueux, on peut considérer, sans crainte d'erreur, cette expérience comme terminée (1).

Le fléchissement des germes s'observe souvent; il survient du 20^e au 35^e passage environ (*zone dangereuse*), mais n'aboutit point fatalement à la cessation de l'expérience, loin de là.

Des passages ont été faits avec 4 échantillons, tous isolés dans des crachats rouillés; par trois espèces animales (souris, lapin, cobaye); voici leur histoire résumée comprenant pour chacun la virulence « au départ », l'évolution des passages, les conclusions particulières à chaque échantillon.

Pneumocoque Sergent (2).

Virulence « au départ ». — Elle n'a pas été déterminée exactement. *Un an après l'isolement*, cet échantillon tuait, dans les muscles, la souris à 10⁻⁶ centimètre cube (3), le

(1) On a eu la curiosité, dans un cas, d'aller jusqu'à épuisement total des tubes gardés à basse température et cela sans résultat utile.

(2) Étudié, en détail, par MM. Sergent, M. Nicolle, Morax et Manouélian, Panisset.

(3) 10⁻⁶ = 1/1.000.000; le nombre de zéros est de 6. Le premier mode de notation est plus simple et plus significatif que le second; il sera employé dans ce chapitre.

lapin à 10³ centimètre cube au moins, et le cobaye à 1 centimètre cube. L'activité initiale n'était certainement pas plus grande. Il s'agit, par conséquent, d'un pneumocoque à *virulence stable*, ce qui explique la marche des passages.

Passages. — On a injecté 1 centimètre cube dans les muscles de la souris et du lapin et dans la plèvre du cobaye. On a fait 162 passages par souris, 92 par lapins et 98 par cobayes. (Quelques « ratés », chez les cobayes, du 25^e au 35^e passages). Finalement, l'activité de chacune des 3 races (souris, lapin, cobaye), était demeurée la même que l'activité observée un an après l'isolement.

Conclusions. — Pneumocoque très virulent pour la souris et le lapin, peu virulent pour le cobaye (pas de chute initiale, cependant). Passages faciles par la souris et le lapin; quelques difficultés, momentanément avec le cobaye. L'activité n'a augmenté ni pour le cobaye, ni pour la souris et le lapin (pour ces derniers, elle ne pouvait guère s'accroître, il faut l'avouer).

Pneumocoque A.

Virulence « au départ ». — Cet échantillon tuait la souris dans les muscles à 1 centimètre cube, le lapin dans la plèvre à 2 centimètres cubes, et le cobaye dans le poulmon à 2 centimètres cubes.

Passages. — On a donc injecté : 1 centimètre cube dans les muscles de la souris, 2 centimètres cubes dans la plèvre du lapin, et 2 centimètres cubes dans le poulmon du cobaye. Les passages sont devenus de plus en plus

pénibles aux environs du 25^e et se sont arrêtés au 32^e (souris), au 41^e (lapin), au 34^e (cobaye).

La culture-origine, n'ayant pas passé par l'animal, conservée dans la glacière après addition de gélatine et repiquée mensuellement, a d'abord perdu sa virulence, — l'a reprise ensuite « spontanément » après un an, — et l'a perdue à nouveau depuis lors. Au moment où l'activité avait reparu d'elle-même, on a fait une série de passages par souris : difficiles à partir du 30^e, ils se sont arrêtés au 43^e. Une tentative de passages par cobayes s'est terminée au 4^e animal.

Conclusions. — Pneumocoque peu virulent pour la souris, à la limite pour le lapin et le cobaye. Arrêt des passages chez les trois espèces.

Pneumocoque H.

Virulence « au départ ». — Cet échantillon tuait, dans les muscles, la souris à 10⁻¹⁰ centimètre cube, le lapin à 1 centimètre cube, et le cobaye à 4 centimètres cubes.

L'activité pour le lapin et le cobaye a rapidement baissé.

Passages. — On a injecté : 1 centimètre cube dans les muscles de la souris, 2-4 centimètres cubes dans les muscles du lapin et 2 centimètres cubes dans la plèvre du cobaye. On a fait : 30 passages par la souris (sans difficulté; la virulence, pour les trois espèces, n'avait pas varié à la fin de l'expérience; 25 passages par le lapin (pénibles à partir du 20^e); 21 passages par le cobaye (très pénibles au moment où on s'est arrêté).

Conclusions. — Pneumocoque très virulent pour la

souris, peu virulent pour le lapin, à *la limite* pour le cobaye. Passages faciles par la souris ; la virulence demeure la même, à la fin, pour les trois espèces (elle ne remonte donc pas pour le lapin et le cobaye). Passages tendant à s'arrêter chez le lapin et le cobaye ; (ils auraient certainement échoué en fin de compte).

Pneumocoque 286.

Virulence « au départ ». — Cet échantillon tuait dans les muscles, la souris à 10^{-11} centimètre cube, le lapin à 10^{-7} centimètre cube, le cobaye à 1 centimètre cube. L'activité a rapidement fléchi pour le lapin et le cobaye.

Passages. — On a injecté 10^{-1} centimètre cube dans les muscles de la souris, 1 centimètre cube dans les muscles du lapin (au début, 1, 2 centimètre cube dans les veines) et $1/4$ centimètre cube dans le testicule du cobaye. Les passages n'ont offert aucune difficulté chez la souris ; chez le lapin et le cobaye, quelques « ratés », du 20^e au 30^e.

La *virulence* a été *titrée*, pour chaque race sur les trois espèces, *tous les 10 passages*, et voici ce que l'on a observé :

Passages par souris. — L'activité ne change pas pour la souris ; elle ne croît pas pour le cobaye, elle augmente un peu pour le lapin, au regard du fléchissement observé avant les passages ; (à la fin, on tue, dans les muscles, avec 10^{-1} centimètre cube).

Passages par lapins. — L'activité ne change pas pour la souris ; elle ne croît pas pour le cobaye, elle augmente

progressivement pour le lapin; (à la fin, on tue dans les muscles avec 10^{-7} centimètre cube, comme avant le fléchissement indiqué).

Passages par cobayes. — L'activité ne change pas pour la souris; elle ne croît pas pour le cobaye, elle augmente progressivement pour le lapin; (à la fin, on tue dans les muscles avec 10^{-5} centimètre cube).

Conclusions. — Pneumocoque très virulent pour la souris et le lapin, peu virulent pour le cobaye. Fléchissement rapide pour le lapin et le cobaye. Passages faciles par la souris, quelques difficultés, momentanément, avec le lapin et le cobaye. Après 40 passages, ne remonte pas pour la souris (ce qui paraît d'ailleurs impossible). Ne remonte pas pour le cobaye. Remonte (vers la virulence « au départ ») pour le lapin : peu, par l'organisme de la souris; presque totalement, par celui du cobaye; totalement par celui du lapin.

Conclusions générales.

Le nombre considérable de ces expériences, qui s'étendent sur des années, autorise à formuler sans crainte les conclusions suivantes :

Passages par la souris. — 1° Les pneumocoques peu virulents (pour cette espèce) s'arrêtent.

2° Les pneumocoques très virulents font indéfiniment des passages. L'activité pour la souris demeure telle quelle; l'activité pour le lapin n'augmente pas ou s'accroît légèrement, selon le degré de virulence « au départ » vis-à-vis du lapin; l'activité pour le cobaye ne s'accroît point.

Passages par le lapin. — 1° Les pneumocoques à la limite (pour cette espèce) s'arrêtent.

2° Les pneumocoques à virulence forte mais fragile (1) font des passages (avec quelques « ratés » momentanément). L'activité pour le lapin remonte au point origine; l'activité pour la souris demeure telle quelle (c'est-à-dire forte); l'activité pour le cobaye ne s'accroît point.

3° Les pneumocoques à virulence forte et stable font indéfiniment des passages, sans difficulté, même momentanée. L'activité demeure telle quelle pour le lapin et la souris, c'est-à-dire forte, ainsi que pour le cobaye; (elle ne s'accroît donc point au regard de celui-ci).

Passages par le cobaye. — 1° Les pneumocoques à la limite (pour cette espèce) s'arrêtent.

2° Les pneumocoques peu virulents font des passages (avec quelques « ratés » momentanément). L'activité ne remonte pas pour le cobaye (c'est-à-dire qu'elle reste faible); elle demeure telle quelle (c'est-à-dire forte) pour le lapin, ou s'accroît notablement, selon le degré de virulence « au départ » vis-à-vis du lapin; elle demeure telle quelle, c'est-à-dire forte pour la souris.

En résumé. — 1° Les pneumocoques très-actifs pour la souris (leur virulence est toujours stable vis-à-vis de cette espèce), et les pneumocoques très actifs et à virulence stable pour le lapin demeurent tels quels au cours des passages par les trois espèces; (ils ne sauraient guère remonter, répétons-le).

2° Les pneumocoques peu actifs pour la souris ou à la

(1) Je reviendrai plus loin sur le sens de cette expression.

limite pour le lapin et le cobaye s'arrêtent, au contraire.

3° Les pneumocoques peu virulents pour le cobaye ne remontent jamais, quelle que soit l'espèce animale qui sert à faire les passages.

4° Les pneumocoques très actifs pour le lapin, mais à virulence fragile, récupèrent plus ou moins complètement, selon l'espèce employée aux passages, l'activité qu'ils possédaient au sortir de l'organisme humain et qui avait rapidement fléchi.

C'est là *l'unique résultat positif qu'ait fourni cette longue série de passages*. Je ne reviens pas sur les autres résultats, tous négatifs. Cependant, il est à peine nécessaire de remarquer qu'ils n'en sont pas moins importants, puisqu'ils vont à l'encontre d'une opinion très répandue. Il ne s'agit nullement d'étendre à d'autres microbes des résultats obtenus avec les seuls pneumocoques, mais les faits demeurent : malgré une étude prolongée, on n'a réussi qu'à « remonter » une virulence momentanément tombée, dans l'espèce microbienne en question. Et, encore, on peut se demander quel rôle il faut attribuer aux passages par les animaux dans ce retour des germes à la virulence. N'a-t-on pas vu que conservés dans la gélatine à 0°, certains pneumocoques, *sans passer par les animaux*, augmentaient quelquefois de virulence?...

Un autre fait reste mystérieux : c'est *l'arrêt des passages* avec certains échantillons, malgré les tentatives employées pour renouer le fil de l'expérience. Ce phénomène paraît impossible à expliquer, actuellement. On remarquera que les passages ne s'arrêtent pas avec les échantillons très actifs ou les animaux sensibles, mais

seulement dans le cas contraire. Pour la race A, peu virulente « au départ » chez les trois espèces animales, il y a arrêt pour les trois séries de passages. Pour la race II, très virulente « au départ » chez la souris, peu virulente chez le lapin et le cobaye, les passages sont indéfinis avec la souris, tendent vers l'arrêt avec les deux autres espèces. Tant qu'elle n'a pas atteint un certain degré, la virulence apparaît *au cours de ces expériences* comme une *charge qui s'épuise*. Ce n'est là, je m'empresse de l'ajouter, qu'une figure, ne dispensant pas d'une explication. Cet arrêt des passages est *esquissé* dans la plupart des séries aux environs du 30^e passage (du 25^e au 35^e), où ils deviennent plus difficiles. Si l'on reste, — faute de mieux, — dans le domaine des comparaisons, l'*arrêt des passages* doit être un phénomène de même origine que l'*arrêt des épidémies*. Le jour où l'on saurait pourquoi cesse une épidémie, cette évolution spéciale des passages serait près d'être éclaircie.

Il a été question, au cours de ces passages, de pneumocoques actifs sur le *lapin*, les uns d'une *virulence stable*, les autres d'une *virulence fragile*. Ces expressions demandent à être expliquées.

L'activité au regard du lapin des pneumocoques isolés chez l'homme (et aussi chez le lapin) a presque toujours fléchi très vite ; la première culture (culture obtenue avec le cerveau du premier lapin) était déjà devenue inoffensive ou ne tuait que sous le volume de 1 centimètre cube. Elle avait cependant *conservé sa virulence initiale* (parfois maxima *vis-à-vis de la souris*). D'autre part, on a vu que les pneumocoques actifs sur les souris gardent cette

activité au moins pendant quelques passages s'ils sont peu pathogènes, et indéfiniment quand ils le sont beaucoup. La virulence pour le lapin se révèle donc des plus fragiles, contrairement à la virulence pour la souris, *fait aussi curieux qu'inattendu*.

Malgré des isolements très nombreux et une technique nouvelle donnant des garanties bien supérieures à celles des méthodes anciennes, j'ai obtenu, exceptionnellement des pneumocoques doués d'une virulence *à la fois marquée et stable* pour le lapin. D'autres chercheurs ont été plus heureux, comme le montrent les trois exemples suivants dûs les deux premiers à l'obligeance de M. M. Nicolle, le troisième à celle de M. E. Sergent (les doses indiquées se rapportent à des cultures de vingt-quatre heures en bouillon-ascite).

I. — Pneumocoque isolé à Constantinople en 1895, d'une angine bénigne chez une fillette. Tuait le lapin à 10^{-4} centimètre cube (au moins), sous la peau. S'est maintenu virulent 6 ans; (abandonné ensuite).

II. — Pneumocoque isolé à Constantinople, en 1898, conjointement avec le bacille de Löffler) du sang du cœur d'un enfant mort de diphtérie. Tuait le lapin à 10^{-6} centimètre cube, sous la peau. S'est maintenu virulent 3 ans; (abandonné ensuite).

III. — Pneumocoque isolé à Paris, en 1900, d'un crachat pneumonique. Tuait le lapin à 10^{-5} centimètre cube sous la peau. S'est maintenu virulent 10 ans. Il a été parlé de ce dernier échantillon dans ce même chapitre, à propos des passages. Il constitue un pneumocoque *à virulence pour le lapin à la fois marquée et stable*, ainsi

que les deux précédents; tous trois s'opposent à la plupart des autres pneumocoques cités dans ce travail, germes dont la *virulence pour le lapin est forte, mais fragile*.

Les pneumocoques « M. Nicolle » et « Sergent » n'ont été l'objet *d'aucun soin spécial* lors de leur isolement et des passages par les lapins. Ceux qui les ont étudiés, affirment qu'avec les procédés indiqués dans ce travail, il aurait été extrêmement facile de conserver l'activité de tels germes, si on avait eu la chance d'en rencontrer.

On est donc fondé à les considérer comme vraiment rares. A noter, — à propos de cette virulence souvent fragile pour le lapin, — que *l'inoculation directe* des produits pathologiques (crachats, pus) au lapin et les *passages directs* par lapin (cerveau des animaux infectés) ont donné des résultats encore plus mauvais que la technique habituelle.

CHAPITRE VII

APERÇU SUR QUELQUES PNEUMOCOQUES DES ANIMAUX

On ne parle guère que des pneumocoques humains dans les ouvrages classiques; aussi m'a-t-il paru intéressant de résumer ici les principales données qu'on possède sur les pneumocoques des animaux. Leur histoire est d'ailleurs encore peu avancée.

Jusqu'en 1906, on ne trouve sur eux que des données fragmentaires. Il en est fait mention dans plusieurs travaux sur la flore microbienne du poumon des animaux bien portants. Dürck (1), sur 10 porcs, rencontre 2 fois le pneumocoque dans le poumon, tuant la souris; chez le bœuf, le cheval, le veau il existerait d'autres germes (streptocoque, staphylocoque, coli, sarcines). Beco (2) note la présence du pneumocoque dans les poumons de la vache, du cheval, exceptionnellement du chat. Boni (3), sur 20 porcs, trouve 14 fois des germes pathogènes dans ce même viscère, et le plus souvent le pneumocoque, peu

(1) *D. Arch. f. Kl. Med.* 1897, Bd. 58, p. 358.

(2) *Arch. Med. Exp. et An. Path.* 1899, tome XI, p. 317.

(3) *D. Arch. f. Kl. Med.* 1901, Bd 69, p. 542.

virulent d'ailleurs. Kälble l'a trouvé dans les ganglions trachéo-bronchiques du porc; Quensel, dans le poumon du veau (1).

Pneumocoques des cobayes.

En 1906, M. M. Nicolle, à propos de ses études sur la morve expérimentale du cobaye, a fait connaître le pneumocoque qui détermine la « maladie du nez » chez cette espèce. Les affections à pneumocoques étant peu connues chez les animaux, je reproduis la description clinique qu'il a donnée (2). La maladie peut revêtir deux formes, selon la présence ou l'absence du jetage nasal.

« Formes nasales. — Elles débutent par de l'humidité des narines, à laquelle fait suite un jetage séreux, puis séro-purulent, qui se concrète en couches épaisses, obstruant plus ou moins l'entrée du nez. Dès les premiers stades de l'infection, le mucus nasal contient en abondance le germe spécifique, que l'on identifiera facilement par l'examen microscopique et les cultures. Les animaux atteints ne tardent pas à maigrir et à présenter, dans bien des cas, une dyspnée accentuée. Ces phénomènes sont susceptibles de s'amender *pro tempore* et même de guérir, souvent en apparence seulement, après des alternatives de mieux et de plus mal. Puis on voit, d'ordinaire, la cachexie s'installer définitivement à un moment donné et enlever les sujets au bout d'un temps variable (de 6 semaines à 2 mois, parfois davantage). La fin peut être hâtée par

(1) Zsch. f. Hyg., 1902, Bd 40, p. 505.

(2) Ann. I. Pasteur, 1906 p. 702.

l'exacerbation des *troubles respiratoires* ou par l'éclosion d'*accidents péritonéaux* suraigus ».

« A l'autopsie, on peut ne rencontrer aucune lésion spéciale. Il est rare, cependant, que la dégénérescence graisseuse du foie fasse totalement défaut dans les cas extrêmes; l'organe est converti en un bloc adipeux jaune grisâtre. Le sang fournit, presque toujours, des cultures positives; à son défaut, la rate et surtout le poumon se montreront fertiles. A côté de ce premier type anatomique, caractéristique de la *forme nasale pure*, nous devons en citer d'autres, qui répondent à la *forme nasale compliquée*. Le plus fréquent se traduit, comme la clinique permettait de le deviner, par de la *broncho-pneumonie*. Inutile de décrire ses diverses variétés; disons seulement que, lors des pseudo-guérisons, le bloc pulmonaire splénisé, adhérent à la plèvre, peut se carnifier progressivement, sans cesser de contenir des germes pathogènes. Après la broncho-pneumonie, vient la *péritonite*, exprimée par un épanchement jaune verdâtre, contenant des flocons fibrineux en suspension et accompagné de fausses membranes épaisses, qui recouvrent les viscères abdominaux, — le tout riche en germes visibles au microscope et aisément cultivables. A la péritonite, s'adjoint constamment la tuméfaction des ganglions inguinaux, souvent noyés dans une zone œdémateuse. Enfin la pleuro-péricardite constitue la complication la moins communément observée de la forme nasale. »

« *Formes extra-nasales.* — Plus rares et affectant une allure très rapide; tantôt, on a affaire à une *septicémie*, tantôt à une *broncho-pneumonie*, ailleurs à une *péritonite*.

Cette dernière peut se déclarer après la mise-bas et enlève alors les cobayes femelles en 3-4 jours; les autres se voient à peu près exclusivement au plus fort des poussées épidémiques. » (M. Nicolle).

En dehors de la « maladie du nez », qui sevit par poussées épidémiques, il est une seconde série de cas où l'on peut observer des infections pneumococciques. M. Nicolle a également attiré l'attention sur ce point. Le pneumocoque se rencontre chez les *cobayes sains*, à l'état saprophytique, au niveau des voies digestives et respiratoires, et chez les *cobayes d'apparence saine*. Sur 4 cobayes bien portants, sacrifiés dès leur entrée au laboratoire, j'ai rencontré chez 3 d'entre eux des pneumocoques non douteux dans le mucus nasal et buccal; ils paraissaient d'ailleurs peu nombreux au regard des multiples germes étrangers (staphylocoque, streptocoque, pneumo-bacille, etc.). Sans doute, ce sont de pareils pneumocoques qui entrent fréquemment en activité à la suite de l'injection de produits étrangers, bactéries vivantes ou mortes, ou substances diverses, et manifestent alors cette activité sous forme d'infections localisées (péritonite, pleuresie), ou septicémiques. La « sortie » est particulièrement à redouter chez les cobayes hypersensibles. Dans les expériences les plus diverses, poursuivies depuis son travail sur la morve (administration de toxines variées et de microbes, vivants ou morts, non moins variés), M. Nicolle a pu se convaincre de la *banalité* véritable du phénomène observé par lui. A part quelques poussées épidémiques somme toute assez rares, et un nombre limité de cas sporadiques, les infections pneumococciques des cobayes, dans leurs différentes formes, recon-

naissent pour cause la « sortie » des germes, provoquée par des injections toxiques ou virulentes. A la vérité, les pneumocoques apparaissent volontiers en même temps que la *pasteurella* (comme l'a indiqué également M. Nicolle), mais leur isolement n'offre aucune difficulté.

Cette « sortie des pneumocoques » est intéressante encore à un point de vue général. Elle représente le type d'une *infection secondaire* : les pneumocoques envahissent secondairement l'organisme d'un cobaye atteint d'une maladie primitive (infection morveuse expérimentale, par exemple). En clinique humaine, le même phénomène doit pouvoir être observé : c'est un mécanisme semblable qui amène sans doute la sortie du « streptocoque », dans la scarlatine, par exemple.

Ces faits d'expérience posent aussi le problème de la virulence sous un jour particulier. Les pneumocoques, isolés dans le pus péritonéal ou dans le sang des cobayes ayant succombé, semblent devoir être doués d'une virulence forte, en particulier vis-à-vis du cobaye. *Il n'en est rien*. Presque toujours, ces germes, dès leur première culture, à la sortie de l'organisme, se montrent inactifs vis-à-vis des cobayes (1) et des lapins; leur virulence au regard de la souris demeure également faible, parfois nulle. Comment concilier ce fait avec la banalité des infections pneumococciques chez le cobaye? Très facilement. Ce que nous présente l'examen clinique, — la même remarque a été appliquée plus haut à l'homme, — c'est *uniquement*

(1) Le Dr Girard a cependant rencontré jadis, chez des cobayes, quelques échantillons virulents pour cette même espèce. Il s'agissait certainement là de cas exceptionnels, d'autant plus intéressants d'ailleurs.

l'image d'une infection plus ou moins sévère, où l'intensité des phénomènes observés se trouve liée à la virulence de l'agent pathogène et à la résistance du sujet atteint. Dans le cas, *habituel ici*, des pneumocoques « de sortie », l'état de débilitation antérieure de l'organisme permet à des germes, inoffensifs pour les cobayes normaux, de végéter sans peine *in vivo* et de déterminer des accidents toujours graves, souvent mortels. Dans l'expression $V = IR$ (V est la virulence, I l'intensité d'infection, R la résistance de l'animal), R étant très faible, V l'est également. Ainsi ces pneumocoques « de sortie » qui amènent une infection très intense, voire mortelle, pourraient faire croire à une virulence très forte; cette erreur n'est possible que grâce à l'état des animaux, affaiblis par l'injection microbienne ou toxique antérieure.

Au point de vue bactériologique, tous ces germes présentent les caractères mentionnés par M. Nicolle, d'après les travaux du Dr Girard. Les échantillons saprophytes du cobaye que j'ai rencontrés sont semblables. Aspect lancéolé classique, dans les milieux de culture et les humeurs du cobaye: quelquefois, comme chez les échantillons humains, des chaînettes de type streptococcique ou des formes bacillaires peuvent coexister avec les éléments lancéolés; capsule, extrêmement développée dans le pus de péritonite du cobaye (c'est dans ces conditions que la capsule du pneumocoque est le plus facile à colorer); cultures maigres dans le bouillon ordinaire, plus abondantes dans les milieux additionnés d'ascite; cultures en bouillon-sang d'aspect chocolat, puis vert fluorescent. En milieu T, les cultures sont plus ou moins riches; le dépôt (inconstant) est toujours de

consistance homogène, jamais grumeleuse. Sur gélose au milieu T, l'aspect des colonies peut différer du type « goutte de rosée » ; quelquefois, on observe des colonies légèrement jaunâtres et plus opaques, comme chez certains pneumocoques d'origine humaine. On a vu que leur virulence, éprouvée par l'injection intra-musculaire, paraît en général faible. Le Dr Girard a tué le cobaye par injection intrapéritonéale (péritonite aiguë), et reproduit la « maladie du nez » par inoculation de ce pus sur la pituitaire. Tous les spécimens que j'ai observés étaient insolubles dans la bile, les uns avirulents, les autres faiblement virulents. Ces derniers ont été conservés suivant le procédé de la gélatine, et repiqués mensuellement : l'un a perdu son activité, les autres l'ont gardée, avec ou sans fléchissement selon les cas.

Pneumocoques des lapins.

M. Nicolle a constaté la grande rareté des infections pneumococciques « spontanées » des lapins; mais il a vu « sortir » assez souvent le pneumocoque chez les sujets sains (en apparence ou en réalité), d'abord dans ses recherches sur le phénomène d'Arthus, puis au cours d'autres travaux où les animaux étaient traités par des injections de toxines ou de microbes. Parfois la *pasteurella* de la « maladie du nez » des lapins apparaissait en même temps.

Les 4 échantillons que j'ai eu l'occasion d'étudier, reconnaissent cette même origine. Ils ont été rencontrés à des époques et dans des expériences différentes et sont dûs à l'obligeance de MM. M. Nicolle, Jouan, Cesari, Alleaux.

Échantillon 299. — Origine : sang d'un lapin ayant reçu une injection intra-veineuse de bacilles de Shiga, tués par l'alcool-éther. Première culture maigre; cultures suivantes abondantes, solubles dans la bile. Très actif sur les souris (1/1.000.000 centimètre cube) et les lapins (même dose).

Échantillon Jouan. — Origine : sang d'un lapin inoculé avec la bactérie charbonneuse. Pneumocoque virulent, offrant des cultures constamment maigres et solubles dans la bile; actif sur les souris (1/1.000 centimètre cube) et sur le lapin (1 centimètre cube). A conservé intégralement son activité par des passages mensuels en gélatine.

Échantillon Cesari. — Origine : sang d'un lapin inoculé avec le bacille de Schmorl. Cultures maigres, solubles dans la bile. Actif « au départ » sur les souris (1 centimètre cube) et les lapins (1/10 centimètre cube). Après plusieurs passages en gélatine, tuait les souris à 1/1.000 centimètre cube.

Échantillon Alleaux. — Origine : sang d'un lapin inoculé avec le bacille de Schmorl. Cultures maigres, solubles dans la bile. Actif « au départ » sur les souris (1 centimètre cube) et les lapins (1/10 centimètre cube). Après plusieurs passages en gélatine, les souris à 1/100 centimètre cube, puis a perdu son activité.

Tous ces échantillons sont donc virulents, à un degré variable, pour le lapin. Il est curieux de constater que :

1° Les pneumocoques virulents pour le lapin semblent rares chez l'homme et fréquents chez le lapin;

2° Les « pneumocoques de sortie » se sont toujours montrés virulents pour le lapin, quand ils proviennent

du lapin, et constamment avirulents pour le cobaye (et le lapin), quand ils proviennent du cobaye.

Pneumocoques d'autres animaux.

Pneumocoque du cheval. — Origine : abcès pulmonaire à bacille de Schmorl observé par M. Cesari. Culture riche, insoluble dans la bile, avirulente pour la souris et le lapin. Après quelques passages en gélatine, tuait les souris à 1/10 centimètre cube.

Pneumocoque du bœuf (échantillon 315). — Origine : muscle de bœuf présentant des lésions de charbon symptomatique; ce pneumocoque, dû à l'obligeance de M. Legroux, était associé au B. Chauvaci. Culture abondante, insoluble dans la bile. Éléments remarquables par leur petite taille, disposés en diplocoques lancéolés et en chaînettes. Inactif sur les souris.

Pneumocoque du ver à soie (échantillon 316). — Grâce à l'obligeance de M. Pinoy, j'ai pu étudier cet échantillon, qu'il a isolé dans la cavité générale d'un ver à soie atteint de *flacherie*. Ce pneumocoque donne des cultures abondantes en milieu T, insolubles dans la bile; les éléments sont d'une taille supérieure à la moyenne, diplocoques lancéolés très caractéristiques. Il est avirulent pour la souris et le lapin; ultérieurement, on fera connaître cet échantillon en particulier.

Ces quelques données, encore fragmentaires, permettent de soupçonner l'ubiquité du pneumocoque dans la série animale.

CONCLUSIONS

I

Les pneumocoques furent classés en espèce le jour où on les rencontra dans la pneumonie, affection bien caractérisée par ses symptômes et ses lésions. En dehors des complications de la pneumonie, ces microbes causent des maladies des séreuses, de l'œil, de l'oreille, etc., et végètent en saprophytes sur les muqueuses de l'homme sain et de certains animaux. Quatre caractères sont fondamentaux et constants, trop généraux d'ailleurs pour permettre à eux seuls une identification : immobilité, absence de spores, colorabilité par le Gram, capsule. D'autres sont plus spéciaux, mais peuvent manquer : forme lancéolée, maigreur et fragilité des cultures dans les milieux usuels, solubilité dans la bile, action sur l'hémoglobine, pouvoir pathogène décroissant chez la souris, le lapin, le cobaye, les oiseaux. Le critérium de l'agglutination n'a guère de valeur pour l'identification des pneumocoques ; par contre, la présence de ces germes dans l'hépatisation pneumonique compte au nombre de leurs caractères importants.

II

La virulence peut être définie la végétabilité *in vivo*. Elle doit être discernée du pouvoir toxigène, auquel elle n'est pas nécessairement associée. L'intensité d'une infection expérimentale exprime le rapport de la virulence des germes à la résistance de l'animal : la virulence se mesure donc à l'intensité de l'infection, la résistance, nécessairement inconnue, étant supposée constante. C'est une obligation de ne comparer entre elles que des infections du même type clinique (pour les pneumocoques : septicémie de la souris, septico-pyohémie du lapin et du cobaye). Toutes les autres conditions étant égales, la virulence se mesure par le rapport de la dose administrée au temps de survie.

III

Le titrage rigoureux de la virulence s'adresse aux seuls microbes n'ayant jamais passé par l'animal. La méthode de l'inoculation directe des produits pathologiques doit être rejetée : infidèle pour l'isolement, elle est inexacte pour le titrage. La virulence a été calculée sur plusieurs colonies isolées du même produit ; les cultures, faites dans un milieu de composition peu variable ; l'emploi d'humeurs (ascite) réduit au strict minimum, souvent supprimé.

Les pneumocoques des malades possèdent une activité fort inégale vis-à-vis de la souris (variant de 1 à 100.000.000.000) ; la sensibilité de cette espèce animale a été d'ailleurs exagérée. Ils se montrent rarement virulents chez le lapin, exceptionnellement très virulents.

Les pneumocoques très actifs pour le lapin sont toujours très actifs pour la souris; les pneumocoques peu actifs pour le lapin offrent au regard de la souris une activité variable. Une minorité de pneumocoques tuant la souris tue le lapin.

Les pneumocoques très actifs pour la souris peuvent être peu actifs pour le lapin; les pneumocoques moyennement ou peu actifs pour la souris sont généralement inactifs pour le lapin.

Les pneumocoques humains se montrent exceptionnellement virulents pour le cobaye, et cette virulence reste toujours faible.

Les pneumocoques actifs pour le cobaye sont toujours très actifs pour la souris et toujours actifs pour le lapin; la réciproque n'est point vraie.

IV

Les cultures pneumococciques virulentes sont souvent maigres, fragiles, solubles dans la bile. La solubilité dans la bile est un caractère excellent, quoique inconstant, de l'espèce, et présente des rapports importants avec la virulence.

La plupart des pneumocoques actifs sur le lapin (et *a fortiori* ceux qui sont actifs sur le cobaye) sont solubles. La proposition inverse serait inexacte.

Les pneumocoques inactifs sur la souris sont insolubles. Les pneumocoques moyennement actifs ou très actifs ($1/100$ à $1/10.000.000.000$ centimètre cube) sont solubles. Les pneumocoques peu actifs sont solubles ou insolubles.

Chez un même échantillon, la solubilité dans la bile peut varier. Il s'agit alors de races moyennement ou peu actives sur la souris; (les pneumocoques très virulents conservent en général leur virulence et leur solubilité). La solubilité peut disparaître et la virulence se conserver. Si la virulence apparaît ou réapparaît, la solubilité peut ou non se montrer en même temps.

Il n'existe pas de rapport nécessaire entre la gravité de la pneumonie et la virulence des germes. Cependant une forte virulence pour la souris, jointe surtout à une virulence évidente et *a fortiori* marquée pour le lapin (encore plus pour le cobaye), constitue une sérieuse présomption en faveur d'une activité notable au regard de l'organisme humain (et une quasi-certitude quand il s'agit de malades sans tares ni infections antérieures).

A la virulence pour l'animal, on ne saurait comparer que la gravité de l'infection humaine, et non pas la « virulence pour l'homme ». Celle-ci est impossible à mesurer, puisqu'on ne peut faire des titrages comparatifs chez l'homme sain. La résistance de l'homme fût-elle connue, la « virulence pour l'homme » continuerait à nous échapper. On ignore le nombre de microbes avec lequel le pneumonique est aux prises. La rareté relative des germes dans le sang de ces malades, l'importance des lésions du poumon éloignent la pneumonie humaine de la septicémie expérimentale de la souris et des septicémies vraies, rares d'ailleurs chez l'homme. Les pneumocoques sont peu nombreux dans le sang des pneumoniques et se rencontrent de préférence dans les cas suivis de complications extra-pulmonaires.

V

Les cultures pneumococciques, conservées dans la gélatine physiologique à la glacière, gardent pendant plusieurs années leur vitalité, et pendant plusieurs mois leur activité sur la souris. Les cultures conservées suivant le même procédé, et repiquées en outre mensuellement, gardent, dans la règle, leur virulence pleine et entière pour la souris. Une minorité de germes *oscille* plus ou moins lentement autour de l'avirulence (survie après injection de 1 centimètre cube). Parfois on suit l'oscillation tout entière (disparition *et* réapparition de la virulence); parfois on n'en suit que la moitié (disparition *ou* réapparition de la virulence).

VI

L'étude de très nombreux passages par trois espèces animales aboutit aux conclusions suivantes :

1° Les pneumocoques très actifs pour la souris (leur virulence est toujours stable vis-à-vis de cette espèce) et les pneumocoques très actifs et à virulence stable pour le lapin, demeurent tels quels au cours des passages par les trois espèces.

2° Les pneumocoques peu actifs pour la souris ou à la limite pour le lapin et le cobaye, s'arrêtent, cessant de faire des passages.

3° Les pneumocoques peu virulents pour le cobaye ne remontent jamais, quelle que soit l'espèce (souris, lapin, cobaye) qui sert à faire les passages.

4° Les pneumocoques très actifs pour le lapin, mais à virulence fragile, récupèrent plus ou moins complètement, selon l'espèce employée aux passages, l'activité qu'ils possédaient au sortir de l'organisme humain, et qui avait rapidement fléchi.

VII

Les données qu'on possède aujourd'hui sur les pneumocoques des animaux permettent de soupçonner l'ubiquité de ces germes. Ils jouent un rôle important chez certaines espèces (cobaye), en tant qu'agents d'infections secondaires : « pneumocoques de sortie ».

Vu : le Président,
WIDAL

Vu : Le Doyen,
LANDOUZY

Vu et permis d'imprimer,
Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris.

L. LIARD

